

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID
DARI KALUS AGAVE AMANIENSIS TREL & NOWELL**

TESIS

**TELAH DISETUJUI OLEH PANITIA PENGUJI
PADA TANGGAL 6 MARET 1990**

**MEMENUHI PERSYARATAN PENDIDIKAN
PASCASARJANA PROGRAM GELAR
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**

oleh :

WAHYU UTAMI

PEMBIMBING KETUA

DR. GUNAWAN ENDRAYANTO

PEMBIMBING

DR. NOOR CHOLIES ZAINI

MENGETAHUI

KETUA PROGRAM STUDI ILMU FARMASI

DR. NOOR CHOLIES ZAINI

PANITIA PENILAI/PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. DR. Sutarjadi
Anggota : DR. M Zainuddin
DR. Mulja Hadi Santosa
DR. Gunawan Indrayanto
DR. Noor Cholies Zaini

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah yang Maha Kuasa atas rahmatNya kepada kami selama ini, hingga kami dapat menyelesaikan tesis sebagai persyaratan pendidikan Pasca Sarjana Program Studi Ilmu Farmasi.

Pada kesempatan ini perkenankanlah kami menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada :

Almanater Universitas Airlangga khususnya Fakultas Farmasi dan Fakultas Pasca Sarjana yang telah memberikan kesempatan, bantuan serta fasilitas kepada kami untuk mengikuti program pendidikan Pasca Sarjana.

Tim Manejemen Program Doktor (TMPD) Departemen Pendidikan Republik Indonesia, yang telah memberikan beasiswa selama pendidikan.

Jurusan Biologi Farmasi khususnya Laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang selalu menyediakan fasilitas selama mengikuti program pendidikan.

Laboratorium Analisa dan Kimia Fisika Pusat Universitas Gadjah Mada serta PT. New Interbat yang telah memberikan bantuan pembuatan spektra kromatografi gas.

Bapak DR Gunawan Indrayanto serta Bapak DR Noor Cholies Zaini sebagai pembimbing kami, yang telah banyak memberikan saran, nasehat dan bimbingan selama kami mengikuti program

pendidikan hingga terselesaikannya tesis ini.

Bapak DR Mulya Hadi Santosa serta staf Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan bimbingan dalam analisis dengan GCMS, IR dan NMR.

Semua Bapak/Ibu sejawat staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga khususnya dari jurusan Biologi Farmasi yang selalu memberikan dorongan, saran dan kerja sama yang baik selama kami mengikuti program pendidikan ini.

Kedua orang tua, suami, dua orang putri tercinta serta seluruh anggota keluarga yang senantiasa dengan tulus memberikan bantuan berupa pengertian, dorongan moril maupun materiil serta doa untuk kami selama kami mengikuti pendidikan ini.

Akhirnya, terima kasih juga kami sampaikan kepada semua pihak yang tidak sempat kami sebutkan satu demi satu yang telah membantu ataupun memberikan dorongan kepada kami dalam penyelesaian tesis ini.

Semoga Allah swt senantiasa memberikan balasan yang melimpah. Amien.

Identifikasi steroid dalam kalus dilakukan dengan KLT, GC, HPLC dan GCMS, dengan pembanding kolesterol, stigmasterol, kampesterol, sitosterol dan diosgenin. Dari data KLT, GC dan HPLC menunjukkan bahwa dalam kalus *Agave amaniensis* terdeteksi sterol-sterol yang mempunyai harga R_f maupun waktu retensi (relatif) sama dengan sterol pembanding. Juga pada analisa dengan GCMS diperoleh kromatogram massa yang mempunyai puncak-puncak yang mempunyai harga m/e sama dengan sterol pembanding, yaitu 386, 400, 412, 414 dan fragmen spesifik untuk sterol yaitu 213 dan 255. Jadi dengan analisa fisika kimia ini dapat disimpulkan bahwa kalus *Agave amaniensis* mengandung prekursor steroid yaitu skualen, sterol-sterol yaitu kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol. Adanya triterpen tertentu pada kalus ini menarik untuk diteliti lebih lanjut.

Pada analisis kuantitatif dengan HPLC, didapat hasil bahwa kadar sterol yang diperoleh dari sampel yang dihidrolisis lebih dahulu, lebih besar daripada kadar sterol dari sampel tanpa hidrolisis. Hasil ini bersama sama dengan hasil KLT dari ekstrak kasar fase aseton memberi dugaan bahwa pada kalus *Agave amaniensis* senyawa sterolditemukan baik dalam bentuk bebas maupun bentuk glikosidanya. Tetapi untuk memastikannya perlu dilakukan penelitian lebih mendalam.

Disamping senyawa-senyawa sterol di atas, dari fase kloroform berhasil didapat suatu isolat ; yang berdasar data KLT, IR, NMR, serta TLC Scanner diduga suatu

RINGKASAN

Kemajuan-kemajuan yang telah dicapai di bidang teknik kultur sel tanaman, membuka peluang untuk melakukan pendekatan biosintesis senyawa berkhasiat dari tanaman. Pengetahuan biosintesis ini sangat diperlukan oleh karena sampai sekarang masih banyak senyawa-senyawa berkhasiat yang jalur reaksi serta mekanismenya belum terungkap secara lengkap.

Untuk maksud penelitian biosintesis melalui teknik kultur jaringan tanaman, tahap awal yang dilakukan adalah membuat kultur dan dilanjutkan dengan menentukan jenis metabolit yang ada dalam kultur tersebut. Hal ini merupakan langkah awal yang penting untuk mempelajari faktor-faktor ataupun pengaruh lain yang ikut terkait dalam proses biosintesis, sehingga bisa diperoleh gambaran yang lebih rinci dari proses tersebut.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk isolasi serta identifikasi senyawa steroid dalam kalus *Agave amaniensis* sebagai langkah awal dari penelusuran biosintesis steroid pada sel tanaman tersebut.

Kultivasi kultur dilakukan terhadap kalus yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Fakultas Farmasi UNAIR. Media yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (MS) ditambah dengan hormon kinetin sebesar 5 ppm dan 2,4-D sebesar 0,5 ppm.

senyawa dengan kerangka inti steroid yang mempunyai gugus yang aktif terhadap sinar UV dan polaritasnya mirip dengan sapogenin/alkaloid steroid. Untuk memastikan strukturnya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| UCAPAN TERIMA KASIH | i |
| RINGKASAN | iii |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR TABEL | ix |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| DAFTAR SINGKATAN | xiii |
| BAB I : PENDAHULUAN | 1 |
| BAB II : TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 1. Tinjauan tentang tanaman <i>Agave amaniensis</i> | 6 |
| 2. Tinjauan tentang kultur jaringan tanaman | 6 |
| 2.1. Media kultur jaringan tanaman.. | 8 |
| 2.2. Aplikasi sistem kultur jaringan tanaman untuk bidang farmasi.... | 10 |
| 2.3. Produksi metabolit sekunder dalam sistem kultur jaringan tanaman.. | 10 |
| 2.4. Pemakaian sistem kultur jaringan tanaman untuk studi biosintesis. | 12 |
| 3. Biosintesis steroid | 13 |
| 3.1. Sterol..... | 17 |
| 3.2. Biosintesis sterol..... | 18 |
| 3.3. Sapogenin steroid, alkaloid steroid dan saponin steroid..... | 18 |
| 3.4. Biosintesis sapogenin steroid... | 20 |
| 4. Isolasi dan identifikasi steroid | 22 |
| 4.1. Pemisahan dan pemurnian | 23 |
| 4.2. Identifikasi dengan KLT | 23 |
| 4.3. Pemisahan dengan kromatografi kolom | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4. Identifikasi dengan kromatografi gas | 25 |
| 4.5. Identifikasi dengan HPLC | 29 |
| 4.6. Identifikasi dengan GCMS | 32 |
| 4.7. Identifikasi dengan spektrofotometri merah infra | 33 |
| 4.8. Identifikasi dengan spektrofotometri resonansi magnet inti | 34 |
| BAB III : BAHAN, ALAT DAN METODE | 36 |
| 1. Bahan | 36 |
| 1.1. Bahan Kimia | 36 |
| 1.2. Bahan Percobaan | 36 |
| 1.3. Media | 36 |
| 2. Alat | 37 |
| 3. Metodologi | 37 |
| 3.1. Penyiapan serbuk kalus sebagai bahan percobaan | 37 |
| 3.1.1. Pembuatan kultur kalus... | 37 |
| 3.1.2. Pembuatan serbuk kalus .. | 37 |
| 3.2. Isolasi dan identifikasi steroid dari kalus | 37 |
| 3.2.1. Ekstraksi | 37 |
| 3.2.2. Pemisahan dan pemurnian.. | 37 |
| 3.2.3. Identifikasi | 38 |
| 4. Metode kerja | 38 |
| 4.1. Penyiapan serbuk kalus sebagai bahan percobaan | 38 |
| 4.1.1. Pembuatan kultur kalus | 38 |
| 4.1.2. Pembuatan serbuk kalus | 41 |
| 4.2. Isolasi dan identifikasi steroid dari kalus | 41 |
| 4.2.1. Ekstraksi..... | 41 |
| 4.2.2. Identifikasi steroid dengan KLT | 42 |
| 4.2.3. Pemisahan dan pemurnian dengan kromatografi kolom | 44 |
| 4.2.4. Identifikasi dengan kromatografi gas..... | 45 |
| 4.2.5. Identifikasi steroid dengan HPLC | 45 |
| - Analisis kualitatif..... | 45 |
| - Analisis kuantitatif | 46 |
| 4.2.6. Identifikasi steroid dengan GC/MS..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.2.7. Identifikasi isolat dengan spektrometri merah infra... | 48 |
| BAB IV : HASIL PENELITIAN | 49 |
| 1. Kultivasi kalus | 49 |
| 2. Identifikasi steroid dalam kalus | 51 |
| 2.1. Identifikasi dengan KLT | 51 |
| 2.2. Pemisahan dengan kromatografi kolom | 51 |
| 2.3. Identifikasi dengan kromatografi gas | 51 |
| 2.4. Identifikasi dengan HPLC | 63 |
| 2.4.1. Analisis kualitatif | 63 |
| 2.4.2. Analisis kuantitatif | 63 |
| BAB V : PEMBAHASAN | 75 |
| BAB VI : KESIMPULAN | 82 |
| BAB VII : SARAN-SARAN | 83 |
| BAB VIII: DAFTAR PUSTAKA | 84 |

DAFTAR TABEL

| | | Halaman |
|----------|--|---------|
| Tabel 1. | Macam-macam media yang dicoba untuk kultivasi kalus | 38 |
| 2. | Hasil perhitungan indeks pertumbuhan (IP) dari kalus <i>Agave amaniensis</i> umur 6 minggu pada masing-masing media yang dicoba..... | 50 |
| 3. | Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 21)..... | 58 |
| 4. | Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 22)..... | 60 |
| 5. | Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 23)..... | 62 |
| 6. | Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram HPLC (gambar 24)..... | 65 |
| 7. | Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram HPLC (gambar 25)..... | 67 |
| 8. | Hasil perhitungan estimasi kadar sterol total dan sterol bebas yang terdeteksi dalam kalus <i>Agave amaniensis</i> terhadap kolesterol standar secara HPLC | 74 |

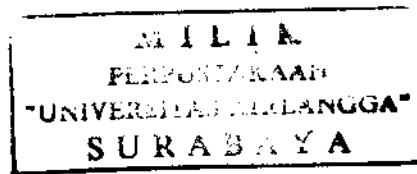
DAFTAR GAMBAR

Halaman

| | | |
|--------|---|----|
| Gambar | 1. Struktur molekul dari berbagai zat pengatur tumbuh | 9 |
| | 2. Kerangka inti steroid | 13 |
| | 3. Struktur inti kolestan, ergostan, stigmastan dan spirostan..... | 14 |
| | 4. Kerangka karbon yang merupakan asal dari senyawa steroid | 15 |
| | 5. Biosintesis senyawa lanosterol dan sikloartenol dari senyawa skualen alifatik | 16 |
| | 6. Struktur molekul kolesterol, stigma-sterol, kampesterol dan sitosterol. | 17 |
| | 7. Biosintesis kolesterol, stigma-sterol dan sitosterol..... | 19 |
| | 8. Struktur molekul beberapa sapogenin steroid..... | 20 |
| | 9. Biosintesis beberapa sapogenin steroid | 21 |
| | 10. Diagram skematis kromatografi gas.. | 27 |
| | 11. Diagram skematis susunan peralatan HPLC | 30 |
| | 12. Prosedur skematis ekstraksi steroid dari kalus <i>Agave amaniensis</i> | 43 |
| | 14. Kalus <i>Agave amaniensis</i> yang ditanam pada media MS dengan penambahan hormon kinetin sebesar 5 ppm dan 2,4-D sebesar 0,5 ppm | 49 |
| | 15. Histogram profil kecepatan pertumbuhan kalus <i>Agave amaniensis</i> pada berbagai macam media yang dicoba | 50 |
| | 16. Profil kromatogram KLT fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 52 |
| | 17. Profil kromatogram KLT fase aseton | |

| | |
|--|----|
| ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> ... | 53 |
| 18. Profil kromatogram KLT fase kloroform ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 54 |
| 19. Profil kromatogram KLT hasil pemisahan dengan kromatografi kolom fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 55 |
| 20. Profil kromatogram KLT hasil pemisahan dengan kromatografi kolom fase kloroform ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 56 |
| 21. Profil kromatogram GC fraksi I fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 57 |
| 22. Profil kromatogram GC fraksi II fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 58 |
| 23. Profil kromatogram GC fraksi III fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 61 |
| 24. Profil kromatogram HPLC fraksi III fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 64 |
| 25. Profil kromatogram HPLC fraksi III fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> dengan diosgenin sebagai standar internal | 66 |
| 26. Kromatogram massa fraksi sterol fase petroleum eter ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 68 |
| 27. Spektra ultra violet kromatogram dengan TLC Scanner CS930 isolat fraksi V fase kloroform ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 69 |
| 28. Spektra IR dari isolat fraksi V fase kloroform ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 70 |
| 29. Spektra H-NMR dari isolat fraksi V fase kloroform ekstrak kalus <i>Agave amaniensis</i> | 71 |
| 30. Kromatogram HPLC kolesterol standar | 72 |

| | |
|--|-----|
| 31. Kurva linier kolesterol standar .. | 72 |
| 32. Profil kromatogram HPLC cuplikan I dan II | 74 |
| 33. Biosintesis senyawa steroid pada sel tanaman <i>Agave amaniensis</i> | 81a |



DAFTAR LAMPIRAN

| | | Halaman |
|----------|--|---------|
| Lampiran | 1. Komposisi media MS | 89 |
| | 2. Skema cara pembuatan media MS | 90 |
| | 3. Contoh perhitungan estimasi kadar sterol..... | 91 |
| | 4. Profil fragmentasi kolesterol, stigma-sterol dan sitosterol | 92 |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|------------|--|
| BAP | : Benzyl Amino Purine |
| 2,4 D | : 2,4-dichlorophenoxy Acetic Acid |
| GA | : Gibberelic acid |
| GC | : Gas Chromatography |
| GCMS | : Gas Chromatography Mass Spectroscopy |
| HPLC | : High Performance Liquid Chromatography |
| IAA | : Indole Acetic Acid |
| IBA | : Indole Butyric Acid |
| IP | : Indeks Pertumbuhan |
| IR | : Infra Red Spectroscopy |
| KJT | : Kultur Jaringan Tanaman |
| KLT | : Kromatografi Lapis Tipis |
| Media MS | : Media menurut Murashige dan Skoog |
| MS | : Mass Spectra |
| NAA | : Naphthalene Acetic Acid |
| H^1 -NMR | : Proton Nuclear Magnetic Resonance |
| UV | : Ultra Violet |

BAB I

PENDAHULUAN

Meningkatnya kebutuhan obat yang mengandung bahan berkhasiat dari tanaman menyebabkan kebutuhan tanaman sebagai sumber bahan berkhasiat juga meningkat (1). Hal ini terlihat pada hasil survey yang dilaporkan, bahwa di Amerika Serikat, sampai pada tahun 1980 tanaman masih menyumbangkan sekitar 25 % dari obat-obatan yang digunakan dalam dunia kedokteran modern (2,3). Kemudian pada tahun 1989 dipublikasikan bahwa pemakaian obat-obatan dari tanaman meningkat sampai mencapai hampir 50 % dari konsumsi obat oleh masyarakat di negara-negara maju (4). Sebagian besar senyawa tersebut, di dalam tanaman ditemukan sebagai metabolit sekunder (1).

Sampai saat ini, kendala-kendala yang masih perlu diperhatikan untuk memperoleh senyawa berkhasiat dari tanaman antara lain ketersediaan lahan yang makin berkurang, faktor gangguan hama penyakit, mutu tanaman yang tidak seragam dan lain-lain (5).

Untuk mengatasi permasalahan-permasalahan seperti diuraikan di atas, maka pada 10 - 20 tahun terakhir ini telah berkembang ilmu bioteknologi sel tanaman. Ada dua macam cara pendekatan yang sering dipilih oleh para pakar bioteknologi sel tanaman untuk mencoba mengatasi permasalahan tersebut yaitu :

1. Perbaikan mutu tanaman dan multiplikasinya (Plant improvement and breeding).

2. Produksi in vitro bahan kimia alami secara bioteknologi sel tanaman.

Pengetahuan tentang jalur biosintesis sangat diperlukan untuk menunjang keberhasilan kedua cara di atas oleh karena dengan pengetahuan ini dapat dipelajari usaha peningkatan kadar metabolit yang dimaksud; misalnya dengan cara penambahan prekursor tertentu atau memotong jalur biosintesis tertentu sehingga keseimbangan metabolisme akan tergeser ke arah produk yang diinginkan. Sebagai contoh misalnya seperti dilaporkan oleh Anderson (6) bahwa kadar sapogenin steroid pada kultur *Agave wightii* dapat meningkat menjadi 2 % dengan penambahan kolesterol pada media. Contoh lain misalnya, dengan penambahan asam tropat sebanyak 500 mM mengakibatkan kadar tripdiolid, suatu zat anti kanker dari kultur *Scopolia japonica* meningkat sebanyak 14 kali lipat (7).

Dengan menggunakan teknik bioteknologi sel tanaman studi tentang biosintesis bahan kimia alami tertentu pada sel tanaman akan lebih mudah dilakukan oleh karena dibanding dengan cara konvensional, teknik ini mempunyai beberapa keuntungan antara lain dapat memperoleh bahan segar dalam waktu singkat, dengan kondisi yang terkontrol dapat diperoleh senyawa-senyawa tertentu, kultur bebas dari pengaruh mikroba dan insekta, dapat dilakukan tanpa tergantung letak geografis dan iklim dan lain-lain (8).

Dengan metode ini, sekarang sudah diketahui secara rinci bagaimana proses biosintesis alkaloid berberin pada sel tanaman (9). Juga dilaporkan bahwa sekarang telah

diketahui sistem enzim kunci pada biosintesis shikonin yaitu 'PHB-glucosyltransferase' dipengaruhi oleh cahaya (9). Roken (11) melaporkan bahwa dengan penambahan beberapa enzim inhibitor tertentu dapat menaikkan kadar diosgenin pada kultur *Dioscorea deltoidea*. Sampai tahun 1980, dilaporkan bahwa lebih dari 40 jenis kultur jaringan tanaman telah berhasil diisolasi senyawa steroid, antara lain dari jenis *Dioscorea spp*, *Solanum spp*, *Digitalis spp*, *Trigonella spp*, *Yucca spp*, *Agave spp* dan lain-lain (12). Senyawa-senyawa steroid tersebut ditemukan baik dalam bentuk sterol-sterol, sapogenin steroid, maupun saponin steroid.

Seperti diketahui, pemakaian obat-obatan yang mengandung senyawa steroid sampai sekarang masih menunjukkan angka yang cukup tinggi. Bila ditinjau dari permintaan di negara-negara berkembang, steroid masih menunjukkan angka kurang lebih 10 % dari permintaan pasar (13). Disamping itu, pemakaian steroid di bidang pengobatan cukup luas antara lain sebagai kardiotonik (digitoksin), prekursor vitamin D (ergosterol), kontrasepsi oral (semisintesis estrogen dan progestin) anti inflamasi (kortikosteroid) dan anabolik (androgen) (14,15). Oleh karena itu penelitian tentang senyawa ini masih perlu ditingkatkan baik mengenai usaha optimalisasi produk maupun analisisnya.

Dari hasil-hasil penelitian tentang tanaman penghasil steroid dengan teknik kultur jaringan tanaman, terlihat bahwa penelitian terhadap tanaman jenis *Agave spp* merupakan

pilihan yang menarik, karena belum banyak publikasi yang melaporkan.

Dari skrining yang dilakukan oleh beberapa peneliti terhadap tanaman *Agave spp* di Indonesia, diketahui bahwa tanaman ini mengandung senyawa sterol, diosgenin, hekogenin, tigogenin dan lain-lain (16,17,18).

Berdasar potensinya sebagai tanaman penghasil senyawa steroid serta pemanfaatan teknik kultur jaringan tanaman seperti diuraikan di atas, maka sangat menarik untuk melanjutkan penelitian tentang biosintesis steroid dalam sel tanaman *Agave spp*. Untuk maksud tersebut, tahap-tahap yang perlu dilakukan adalah :

- membuat kultur,
- menentukan jenis steroid yang ada dalam kultur tersebut,
- mempelajari faktor-faktor yang berpengaruh terhadap pembentukan steroid, dan kemudian dilanjutkan dengan mempelajari sistim enzim serta sistim gen yang bertanggungjawab pada biosintesis ini.

Sebagai langkah pendahuluan, telah dilakukan penelitian percobaan penumbuhan kalus dari beberapa spesies *Agave* yang tumbuh di Kebun Raya Purwodadi Pasuruan. Hasilnya menunjukkan bahwa yang berhasil tumbuh baik kalusnya adalah dari spesies *Agave amaniensis*. Identifikasi pendahuluan dengan KLT dari ekstrak kloroform kalus yang didapat menunjukkan bercak adanya senyawa sterol dan sapogenin steroid (19). Dengan ini dapat diketahui bahwa kalus *Agave amaniensis* mampu membentuk senyawa steroid sampai tahap tertentu, namun belum diketahui identitasnya.

Untuk mengetahui sampai tahap mana senyawa steroid pada sel tanaman *Agave amaniensis* terbentuk, perlu dilakukan identifikasi jenis steroid yang terkandung dalam kalusnya.

Tujuan penelitian :

Penelitian yang akan dilakukan bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa steroid pada kalus *Agave amaniensis*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Tinjauan tentang tanaman *Agave amaniensis*

Klasifikasi tanaman *Agave amaniensis* adalah sebagai berikut (20) :

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledonae
Bangsa : Liliales
Suku : Amaryllidaceae
Marga : *Agave*
Jenis : *Agave amaniensis*

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, kandungan kimia yang terdeteksi dalam tanaman *Agave spp* antara lain adalah sapogenin, diosgenin, tigogenin, hekogenin, sterol-sterol serta senyawa steroid lain yang belum diketahui (21,22).

2. Kultur Jaringan Tanaman

Kultur jaringan atau kultur sel didefinisikan sebagai metode pengisolasian dan pemeliharaan sel, jaringan atau organ tanaman yang dipisahkan dari lingkungan alamiahnya dan ditanam pada media buatan yang sesuai dan dalam keadaan steril sehingga sel-selnya mampu tumbuh dan mengadakan pembelahan.

Bila media yang digunakan cocok, maka sel, jaringan

maupun organ tanaman yang ditanam sebagai eksplan steril akan membelah dan tumbuh menjadi massa sel yang meristenatis dan belum terdiferensiasi yang disebut 'kultur kalus'. Bila kultur kalus ini dipindahkan ke media cair dan diagitasi dengan kecepatan tertentu akan didapat 'kultur suspensi'. Dengan merubah komposisi hormon pertumbuhan yang ada maka dapat diperoleh massa sel yang terdiferensiasi, dan dapat diregenerasikan menjadi tanaman baru. Tergantung dari kombinasi dan konsentrasi hormon yang dipakai, dari eksplan dapat pula langsung diinduksi kultur organ tertentu. Dinding sel tanaman tadi juga dapat dilisiskan dengan enzim tertentu sehingga akan didapat protoplas yang terisolasi. dengan memakai metoda ini maka dimungkinkan untuk melakukan fusi sel, memasukkan organel maupun gen pada sel tadi, sehingga dapat diperoleh tanaman baru dengan sifat-sifat baru (23).

Menurut teori sel yang menyatakan bahwa sel sebagai kesatuan biologis terkecil, mampu mengadakan segala aktifitas kehidupan seperti metabolisme, reproduksi dan tumbuh (24). Atas dasar teori ini maka pada tahun 1902 Haberlandt mengemukakan hipotesis bahwa bila suatu sel tanaman tinggi dipelihara pada media buatan yang cocok akan dapat tumbuh membentuk tumbuhan baru seperti tanaman induknya. Kemampuan sel ini kemudian dikenal sebagai sifat 'totipotensi'. Sebagai kelanjutan dari hipotesis ini, maka pada media buatan sel akan mampu juga melakukan aktifitas metabolisme dan menghasilkan

metabolit primer serta metabolit sekunder.

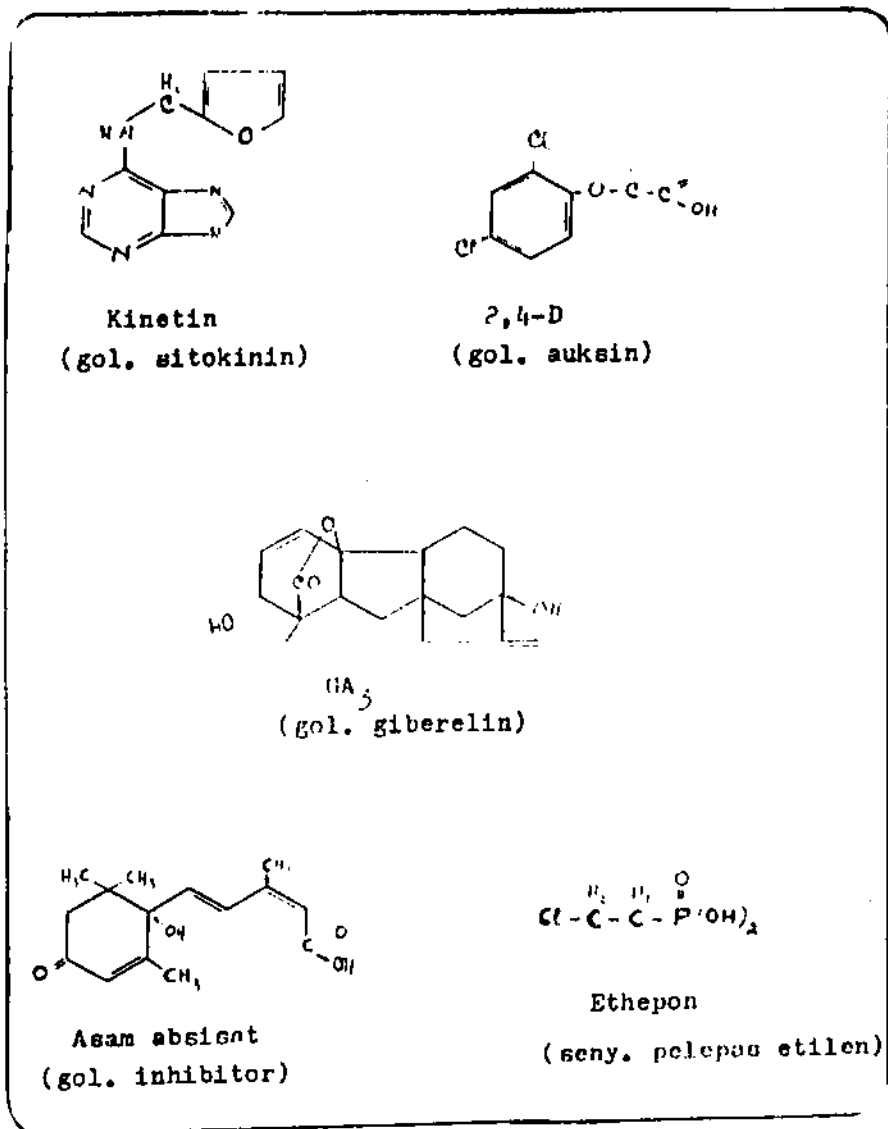
2 1. Media kultur jaringan.

Media pertumbuhan kultur jaringan pada umumnya terdiri dari garam-garam mineral atau nutrien anorganik yang terdiri dari unsur-unsur makro seperti K, N, Na, Mg, P, Ca, S dan Cl; unsur-unsur mikro yang meliputi I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, Al, Ni dan Fe, bersama dengan sumber karbon, vitamin-vitamin, asam-asam amino, zat pengatur tumbuh dan zat tambahan organik lain seperti air kelapa, ekstrak ragi atau kasein hidrolisat (25).

Diantara komponen-komponen tersebut, zat pengatur tumbuh merupakan komponen yang sangat mempengaruhi kultur jaringan sebab selain mempengaruhi pembelahan, perpanjangan dan diferensiasi sel, ternyata juga mempengaruhi pembentukan metabolit dalam sel (26).

Zat pengatur tumbuh dibedakan dalam 5 golongan yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat dan gas etilen. Zat pengatur tumbuh golongan auksin dan sitokinin merupakan zat pengatur tumbuh yang penting dan banyak digunakan. Pengaruh hormon ini sangat bervariasi tergantung pada jumlah, perbandingan dan distribusinya serta macam metabolit yang dipengaruhi (25). Sebagai contoh misalnya kinetin & NAA menstimulasi produksi sitosterol dan stigmasterol dalam kultur sel *Trigonella foenum graecum* (27). Sedangkan 2,4-D dan kinetin hanya memacu produksi sitosterol dalam kultur *Solanum xanthocarpum* (27). Penelitian lain menyatakan bahwa

penambahan kinetin pada media pertumbuhan kultur *Trigonella foenum graecum* hanya meningkatkan pertumbuhannya dan tidak meningkatkan kandungan sitosterol. Tetapi pada penggunaan 2,4-D, selain memacu pertumbuhan juga meningkatkan konsentrasi sterol (27). Berikut adalah gambar struktur molekul dari berbagai zat pengatur tumbuh.



Gambar 1. Struktur molekul dari berbagai zat pengatur tumbuh (25).

2.2. Aplikasi sistim kultur jaringan tanaman untuk bidang farmasi.

Menurut Spoerle dan Becker (28) teknologi ini dapat diaplikasikan untuk beberapa tujuan yaitu :

- mikropropagasi dan perbiakan secara meristem, dipakai untuk mendapatkan bibit tanaman obat unggul dan seragam dalam waktu singkat.
- hibridisasi somatis, dengan cara fusi sel dapat dilakukan hibridisasi dua tanaman (obat) yang tidak mungkin dilakukan dengan cara konvensional.
- produksi metabolit sekunder secara in vitro (lihat sub bab berikut).
- biotransformasi, seperti halnya mikroorganisme sistim KJT dapat melakukan beberapa reaksi biotransformasi tertentu yang spesifik, yang tidak dapat dilakukan baik secara kimia atau mikroorganisme.
- manipulasi genetika; dengan bantuan vektor tertentu dapat dilakukan manipulasi pada suatu tanaman obat sehingga dapat memperbaiki mutunya.

2.3. Produksi metabolit sekunder dalam kultur jaringan tanaman

Studi tentang kandungan metabolit sekunder dari sistem kultur jaringan tanaman telah banyak dipublikasikan, baik mengenai potensi sistem kultur jaringan dalam menghasilkan produk metabolit maupun pemanfaatannya untuk studi jalur biosintesis. Namun demikian, kedua potensi yang dimiliki kultur jaringan tanaman tersebut, sampai saat ini belum dapat

dimanfaatkan secara optimal oleh karena kurangnya pengertian akan persoalan-persoalan yang muncul akibat dikulturkannya sel tanaman, antara lain terjadinya variasi dan ketidakstabilan dari kemampuan produksi/akumulasi metabolit sekunder (29).

Ellis (30) menyatakan bahwa hampir semua golongan senyawa kimia alami telah berhasil dideteksi pada sistem kultur jaringan tanaman. Sampai akhir tahun 1988 telah didapatkan 88 senyawa kimia alami yang diproduksi oleh kultur jaringan, tetapi tidak oleh tanaman asalnya (31). Juga beberapa contoh penelitian tentang isolasi senyawa steroid antara lain dari kultur *Solanum spp* (32,33,34), *Digitalis spp* (35), *Trigonella spp* (36) dan lain-lain.

Dari publikasi-publikasi yang ada, dapat disimpulkan bahwa sistem kultur jaringan dapat memproduksi metabolit sekunder yang secara kualitatif maupun kuantitatif sama, lebih besar atau lebih kecil daripada tanaman asalnya. Telah banyak pula laporan yang menyatakan bahwa ada kalanya sistem kultur jaringan tanaman tidak mampu memproduksi zat spesifik dari tanaman asalnya. Beberapa kemungkinan penyebab dari ketidakmampuan tersebut dikemukakan antara lain karena (37) :

- beberapa enzim atau semua enzim yang bertanggung jawab terhadap proses biosintesis produk represif.
- tidak ada prekursor.
- tidak ada kemampuan penyimpanan produk.
- degradasi produk.

Robert (38) mengemukakan cara-cara pendekatan untuk menaikkan kadar produk tertentu pada sistem kultur jaringan tanaman, yaitu :

- seleksi/skrining untuk mendapatkan sel dengan produktifitas tinggi,
- optimasi media, hormon, prekursor dan elisitor,
- menahami sistem enzim dan regulasinya,
- menahami metoda akumulasi produk,

2.4. Penakaaian sistem kultur jaringan tanaman untuk studi biosintesis .

Telah diketahui bahwa salah satu hambatan dalam penakaaian sistim KJT untuk produksi senyawa kimia alami termasuk obat-obatan adalah kurangnya pengetahuan secara rinci tentang mekanisme biosintesis produk tersebut, terutama dalam hal karakterisasi sistem enzim yang bertanggungjawab serta regulasinya. Stoekigt dan kawan-kawan menyatakan bahwa dengan memakai sistim KJT lebih mudah melakukan isolasi enzim-enzim dan metabolit perantara tertentu bila dibandingkan dengan memakai tanaman utuhnya (38).

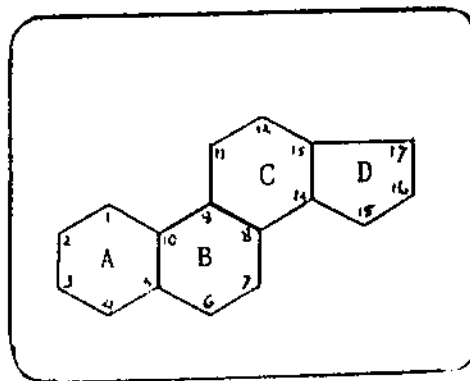
Dengan memakai sistim enzim anobil tertentu telah dapat diperoleh suatu metabolit perantara kunci pada biosintesis alkaloid golongan indol, yaitu striktosidin (38). Peterson dan Alfermann (39) telah berhasil mengisolasi dan mengkarakterisasi dua enzim kunci dari asam rosmarinat dengan memakai kultur suspensi *Coleus blumei*. Juga Heide (10) telah melaporkan bahwa kerja dari sistem enzim kunci pada biosintesis shikonin

dipengaruhi oleh cahaya.

Dengan mengetahui metabolit perantara dan sistim enzim yang berkaitan akan dapat dielusidasikan urutan proses biosintesis dengan lebih rinci.

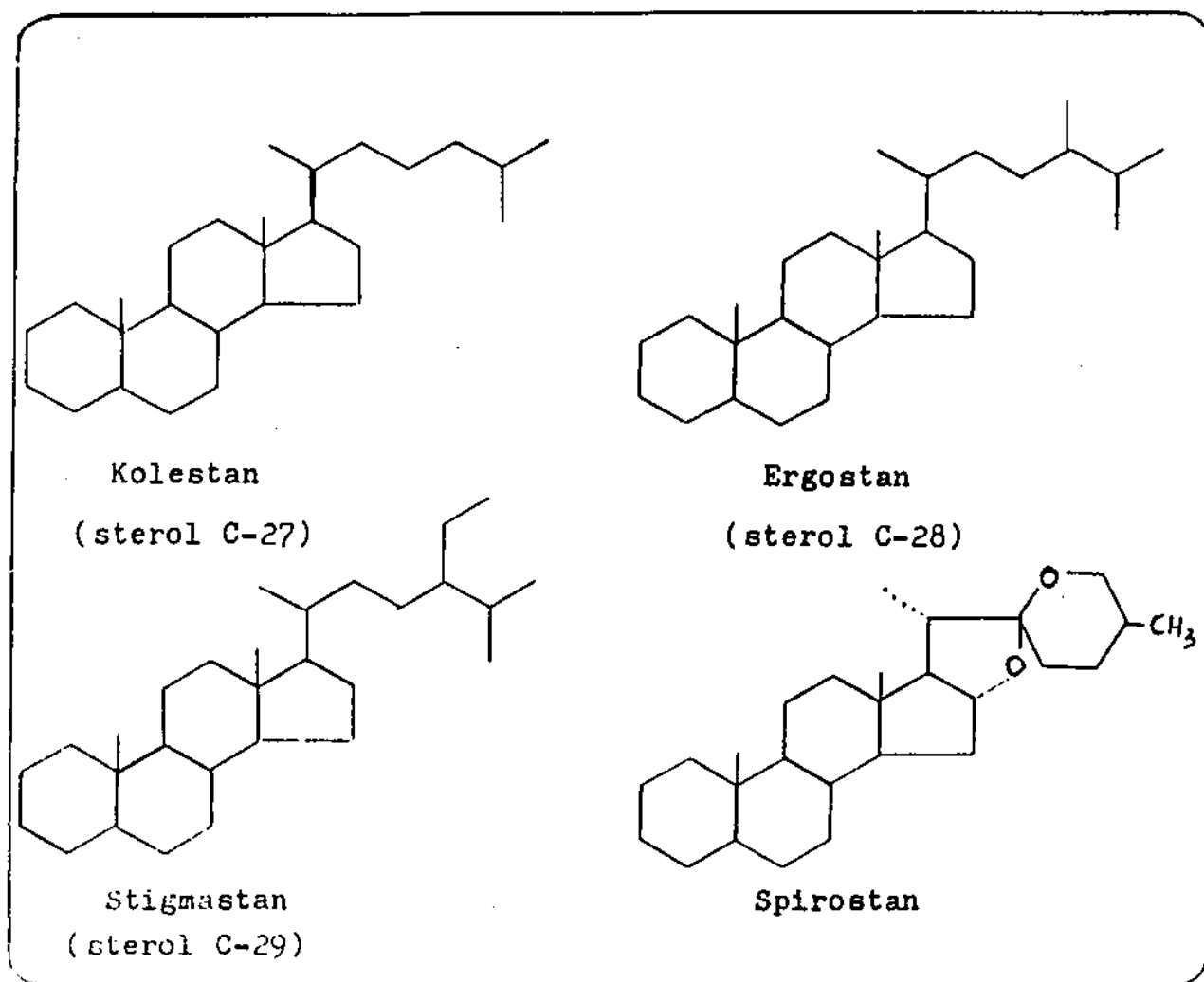
3. Biosintesis steroid

Steroid adalah senyawa yang mempunyai inti siklopentanoperhidrofenantren. Rumus bangun inti steroid ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 2. Kerangka inti steroid

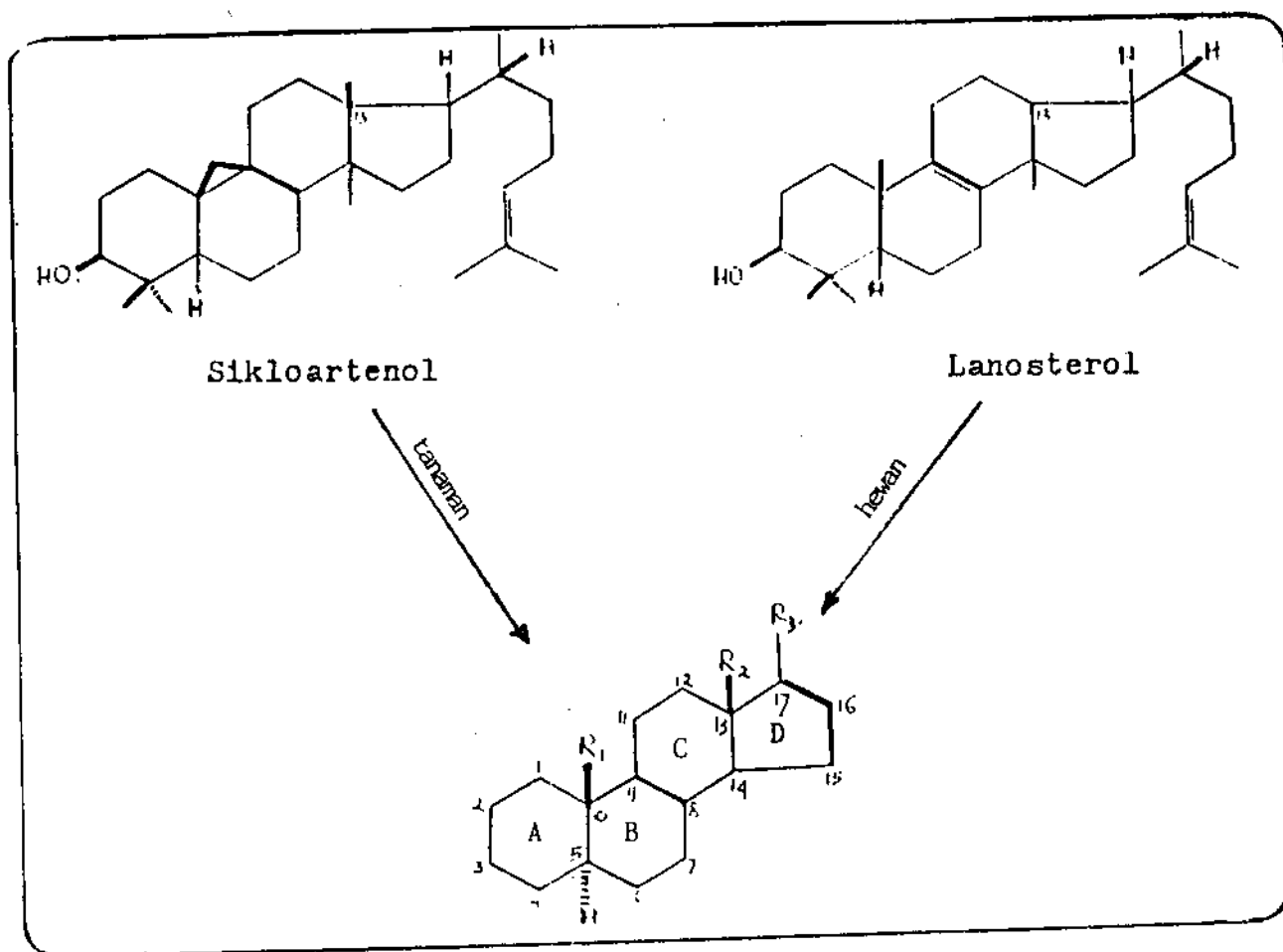
Pada inti tersebut seringkali terikat gugus metil pada atom C-10 (R_1) dan atom C-13 (R_2) dan berbagai rantai samping yang terikat pada atom C-17 (R_3). Berdasarkan rantai samping R_3 bisa dibedakan inti steroid kolestan, stigmasteran (merupakan inti dari sterol-sterol), kolen (merupakan inti dari asam-asam empedu) dan spirostan (merupakan inti dari sapogenin steroid) (40).



Gambar 3. Struktur inti kolesterol, stigmasterol dan spirosterol

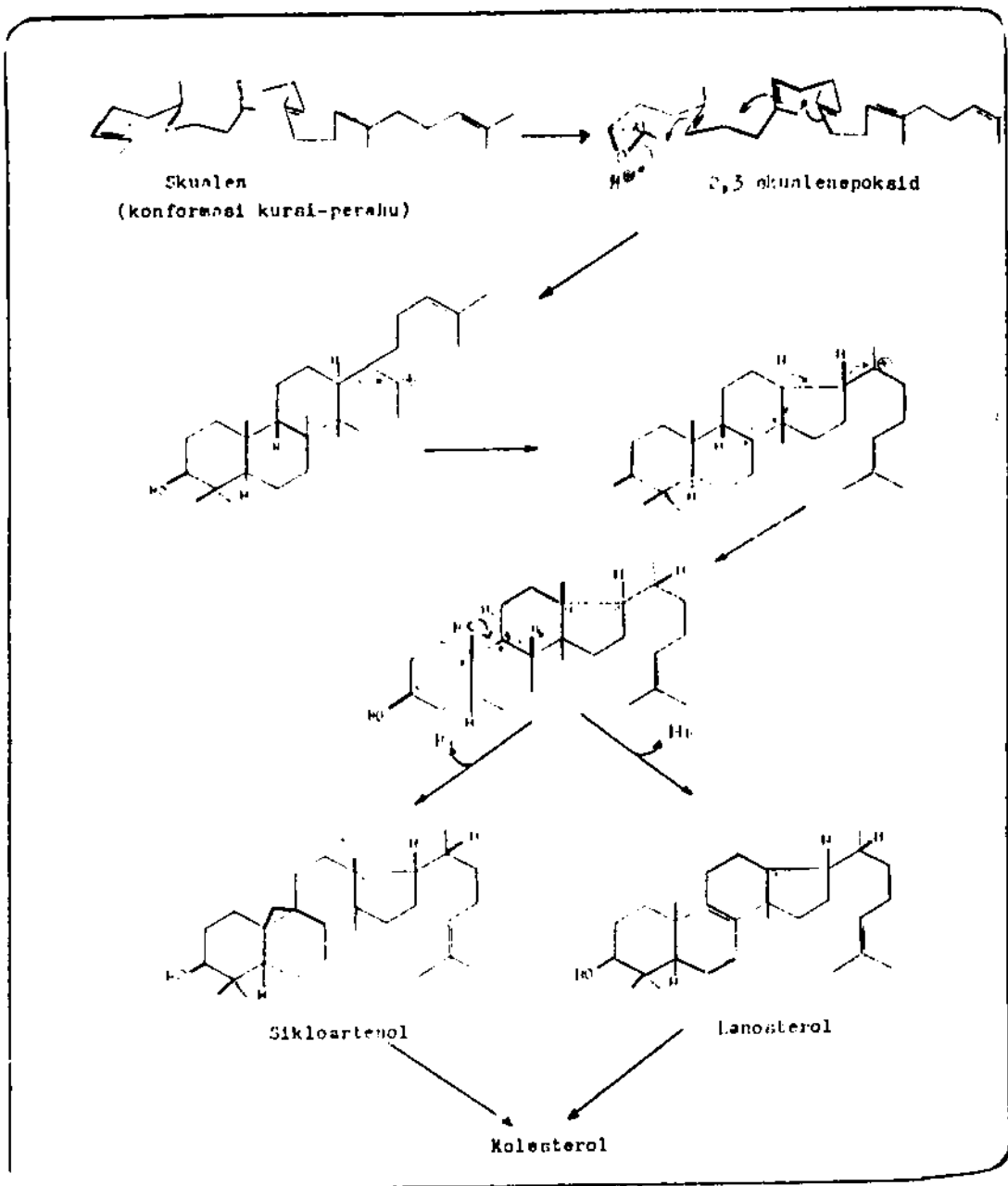
Bila cincin dari inti steroid diproyeksikan pada bidang datar, maka gugus metil pada atom C-10 dan C-13 selalu berada di atas bidang. Hal ini dijadikan dasar konfigurasi bagi substituen yang lain. Untuk substituen yang berada pada satu bidang dengan gugus metil tersebut, dikatakan mempunyai konfigurasi β , sedang yang berada pada bidang yang berlawanan dikatakan mempunyai konfigurasi α (40)

Di alam, steroid terdapat dalam tanaman maupun hewan. Pada umumnya senyawa steroid dalam hewan berasal dari lanosterol, sedangkan steroid tanaman berasal dari sikloartenol (gambar 4) (15,41,42).



Gambar 4. Kerangka karbon yang merupakan asal dari senyawa steroid

Pembentukan senyawa steroid dimulai dari senyawa skualen alifatis. Secara ringkas digambarkan sebagai berikut (gambar 5, gambar 6 dan gambar 7).



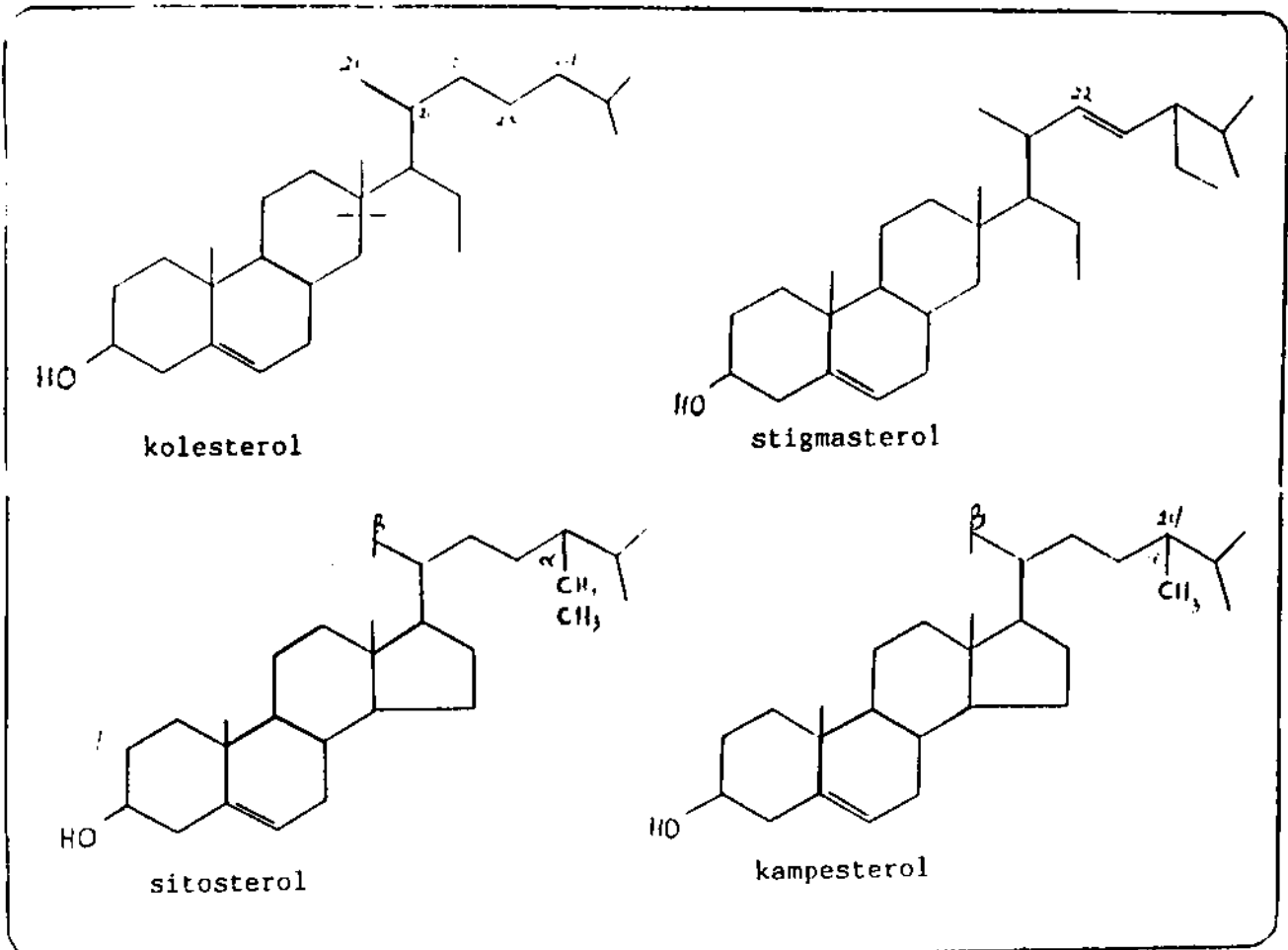
Gambar 5. Biosintesis senyawa lanosterol dan sikloartenol dari senyawa skualen alifatik (15,41,42).

3.1. Sterol.

Sterol alam pada umumnya mempunyai inti kolestan, ergostan atau stigmastan (gambar 3).

Karakteristik senyawa sterol ditunjukkan dengan adanya rantai isoprenoid yang panjang pada atom C-17, mempunyai jumlah atom C 27 sampai 29, dengan gugus hidroksil pada posisi C-3 dan ikatan rangkap pada C-5 & C-22 serta adanya gugus metil pada C-10 & C-13 (41).

Kolesterol, stigmasterol dan sitosterol adalah tipe sterol yang umum dijumpai pada tanaman. Kolestrol merupakan prekursor, bahan awal untuk biosintesis semua jenis steroid tanaman (42, 43).



Gambar 6. Struktur molekul kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol.

3.2. Biosintesis sterol.

Telah diketahui bahwa dalam tanaman terdapat sterol-sterol yaitu kolesterol, stigmasterol, kampesterol, sitosterol dan lain-lain (15,33,41,42).

Jalur biosintesis sterol ini dimulai dari terbentuknya skualen kemudian sikloartenol, dilanjutkan ke pembentukan kolesterol, kampesterol, stigmasterol dan sitosterol.

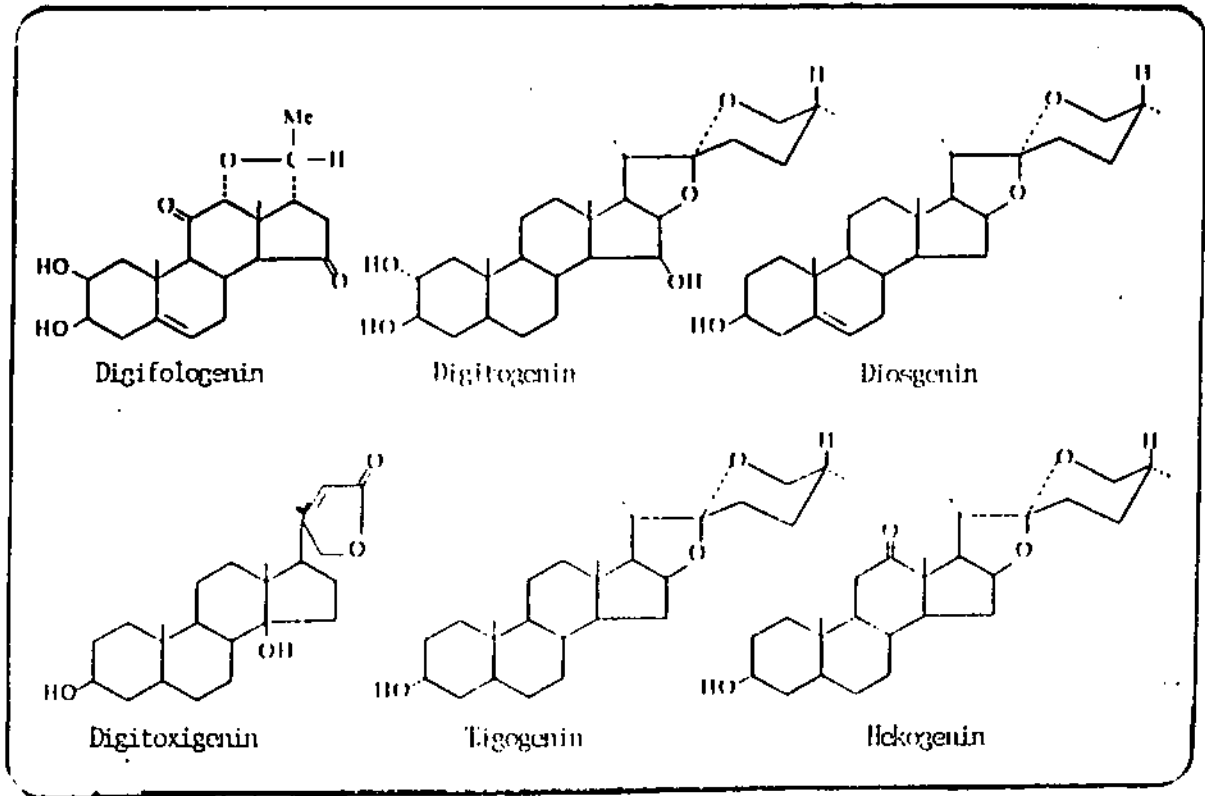
Khusus mekanisme perubahan stigmasterol ke sitosterol atau sebaliknya sampai saat ini masih belum jelas.

Heftmann E dan Indrayanto G (63,33) maupun beberapa peneliti lain mengemukakan bahwa mekanisme yang terjadi adalah dari stigmasterol ke sitosterol. Namun literatur yang lebih baru mengemukakan bahwa stigmasterol dapat terbentuk dari sitosterol (15). Hal ini menunjukkan bahwa penelitian tentang biosintesis perlu ditelusuri lebih lanjut.

3.4. Sapogenin steroid, alkaloid steroid dan steroid

Di dalam tanaman, sapogenin steroid dan alkaloid steroid terdapat dalam bentuk glikosida saponin dan glikoalkaloid (15)

Saponin steroid terdiri dari senyawa steroid sebagai aglikon (sapogenin) yang terikat dengan suatu oligosakarida melalui gugus hidroksil pada posisi 3 β (gambar 8) (15). Sapogenin steroid mempunyai inti spirostan.



Gambar 8. Struktur molekul beberapa sapogenin steroid.

3.4. Biosintesis sapogenin steroid.

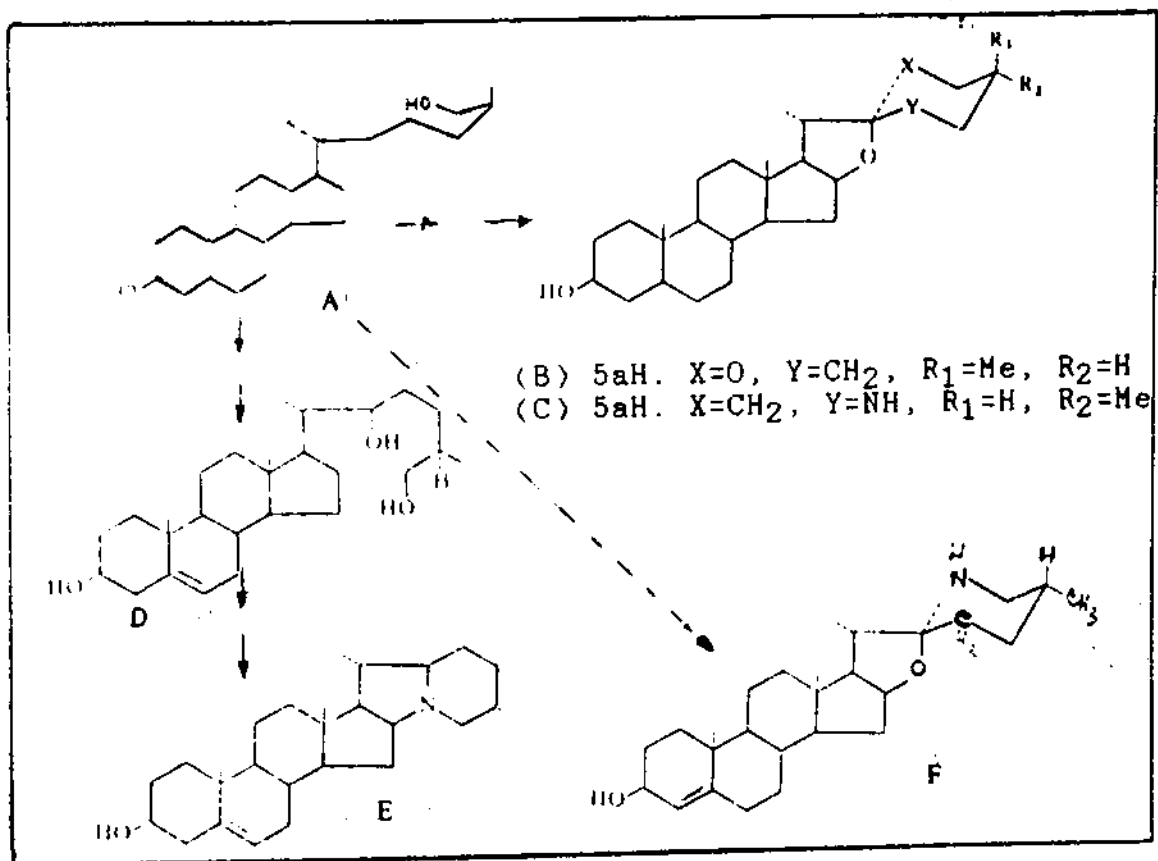
Tschesche (58) dalam penelitiannya dengan menggunakan tanaman *Digitalis lanata* mengemukakan bahwa senyawa 16β -hidroksi-kolesterol (A) merupakan prekursor dalam biosintesis sapogenin steroid : tigogenin (B) dan gitogenin, namun pada tanaman *Solanum spp* ternyata bukan sebagai prekursor untuk tomatidin (C).

Ko Kaneko (59) menyatakan bahwa senyawa dormantiol (D), sapogenin steroid dari *Veratrum grandiflorum* yang

terdeteksi sebagai (25S) -kolesto-5-ene-3 β -22a-26 triol merupakan prekursor dalam biosintesis solanidin (E).

Tschesche juga melaporkan bahwa dalam biosintesis solasodin (F), pemasukan nitrogen terjadi segera setelah hidroksilasi pada C-26 dan sebelum oksidasi lebih lanjut dari rantai samping kolesterol. Setelah aminasi pada C-26 kemungkinan terjadi fungsionalisasi pada C-22, sebelum hidroksilasi pada 16 β .

Peneliti Fiamma Ronchetti (60) melaporkan bahwa senyawa (25S) 5a-kolesto-3 β -26-diol yang diberikan pada tanaman *Lycopersicon pimpinellifolium* diubah menjadi neotigogenin (F) dan tomatidin (D), sementara (25S) 5a furostan-3 β -26-diol diubah menjadi neotigogenin.



Gambar 9. Biosintesis hipotetik beberapa sapogenin steroid dari 26-hidroksi-kolesterol (58,59,60,61).

4. Isolasi dan identifikasi steroid.

Isolasi dilakukan dengan prinsip cara ekstraksi bertahap, kemudian dilakukan pemisahan dan pemurnian dengan kromatografi.

Ekstraksi dan preparasi sampel sangat tergantung pada jenis sampel, polaritas dari kandungan yang dimaksud, apakah polar, semi polar atau non polar dan juga tergantung pada kandungan lain misalnya mengandung lemak atau tidak (44). Bila sampel hanya mengandung sapogenin steroid atau alkaloid steroid dan tidak mengandung lemak, dapat digunakan cara seperti yang dikemukakan oleh Carle (34), yaitu serbuk bahan kering dihidrolisis dengan metanol-HCl, ekstrak yang diperoleh dinetralkan dengan amonia, disaring dan residu dikeringkan. Terakhir diekstraksi dengan kloroform. Untuk sampel yang berlemak dan hanya mengandung sterol tanpa ada jenis steroid yang lain, digunakan cara dari Helmbold (35), yaitu sampel disoksetasi dengan petroleum eter 40-60 selama 48 jam, kemudian disabunkan dan bahan yang tidak tersabunkan diekstraksi dengan eter. Bila bahan mengandung steroid polar, semi polar dan non polar bisa dipilih cara seperti yang dikemukakan oleh Indrayanto (33). Serbuk bahan kering diekstraksi dengan petroleum eter 40 - 60 selama 3 X 2 jam (kalau perlu disabunkan), lalu residu diekstraksi dengan aseton (untuk menarik steroid semi polar) dan akhirnya residu diperlakukan sesuai dengan cara Carle di atas (untuk menarik sapogenin steroid dan alkaloid steroid).

4.1. Pemisahan dan pemurnian.

Pada umumnya senyawa organik hasil isolasi atau sintesa dan produk biologi, sulit diperoleh dengan derajat kemurnian yang tinggi. Oleh karena itu perlu dilakukan pemisahan dan pemurnian. Pada penelitian ini digunakan cara kromatografi.

Metode kromatografi menjadi pilihan baik untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif oleh karena dengan metode ini dapat dilakukan analisis langsung dari ekstrak tanpa harus dipisahkan/dimurnikan dulu seperti pada pengerjaan dengan prinsip titrasi ataupun spektrofotometri.

Pada dasarnya semua jenis kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Berdasarkan mekanisme pemisahannya, dikenal kromatografi absorpsi, partisi, permeasi, penukar ion dan elektroforesis. Berdasarkan teknik operasionalnya kromatografi dibagi menjadi kromatografi kertas, kolom, lapis tipis, kromatografi gas dan kromatografi cair bertekanan tinggi (HPLC).

4.2. Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Untuk identifikasi pendahuluan, digunakan KLT oleh karena dibanding dengan yang lain, cara ini hanya membutuhkan jumlah cuplikan sedikit, waktu lebih cepat dan memberikan pemisahan yang cukup baik.

Sebagai parameter untuk menentukan letak bercak pada kromatogram KLT adalah harga R_f yaitu hasil bagi

jarak bercak dari titik awal dengan jarak yang ditempuh oleh eluen dari titik awal (45). Faktor-faktor yang mempengaruhi harga R_f antara lain :

- struktur kimia dari senyawa yang akan dipisahkan,
- sifat dari penyerap dan derajat aktifitasnya,
- ketebalan dan kerataan dari penyerap,
- kemurnian eluen atau ketepatan perbandingan eluen bila digunakan dalam bentuk campuran,
- derajat kejenuhan dari bejana,
- teknik eluasi; menurun, menaik, horisontal atau melingkar,
- jumlah cuplikan yang digunakan; cuplikan yang berlebihan menyebabkan penyebaran bercak membentuk ekor ('tailing') yang dapat mengakibatkan kesalahan dalam perhitungan R_f ,
- suhu pemisahan.

Selain letak bercak (R_f), dari kromatogram KLT bisa dilihat spesifikasi jumlah bercak dengan masing-masing warnanya. Dari tiga spesifikasi ini, dengan KLT bisa dilakukan identifikasi suatu senyawa atau deteksi adanya senyawa-senyawa tertentu yang ada dalam bahan sampel yang diperiksa.

4.3. Pemisahan dengan kromatografi kolom.

Kromatografi kolom dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan/memurnikan suatu senyawa tertentu dari campurannya. Sebagai fase diam bisa digunakan aluminium oksida yang telah diaktifkan, silika gel atau

kieselguhr. Sebagai fase gerak/eluen, pada umumnya dipilih sesuai dengan hasil orientasi dengan KLT. Pemisahan dilakukan dengan cara mengalirkan eluen melalui kolom sehingga senyawa hasil pemisahan ditampung sebagai eluat.

Meskipun cara ini memberikan hasil yang cukup baik, namun dalam pengerjaannya memerlukan waktu yang lama serta ada kesulitan mempertahankan kondisi kolom tetap baik selama pemisahan/pemurnian.

4.4. Identifikasi dengan kromatografi gas.

Pada kromatografi gas, mekanisme kerja yang mendasari terjadinya pemisahan adalah proses partisi. Pada sistem ini dikenal parameter K yaitu koefisien partisi/distribusi yang dinyatakan dengan persamaan :

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

C_s = konsentrasi solut dalam fase diam
 C_m = konsentrasi solut dalam fase gerak

Harga K adalah spesifik untuk masing-masing senyawa (suatu solut tertentu dalam sistem tertentu akan mempunyai harga K yang tertentu). Dari persamaan kesetimbangan dinamis ini, fraksi waktu yang dialami solut dalam fase gerak ekuivalen dengan fraksi solut yang berada dalam fase gerak. Sehingga $K = \frac{V_s}{V_m} = k'$ yang disebut faktor kapasitas yaitu merupakan perbandingan jumlah molekul solut dalam fase diam dan fase mobil.

Sebagai parameter, digunakan waktu retensi (t_R) yaitu waktu yang diperlukan solut untuk mencapai jarak sepanjang kolom. Untuk suatu sistem kromatografi

tertentu harga t_R hanya dipengaruhi oleh harga K .

Efisiensi kolom dalam kromatografi, sering dianalogikan dengan harga H (HETP/ 'Height Equivalent to a Theoretical Plate') yang dirumuskan sebagai :

$$H = \frac{L}{n}$$

L = panjang kolom

n = jumlah 'plate teoritis'

Makin besar jumlah n , harga H akan semakin kecil yang menyebabkan efisiensi kolom lebih baik. Jumlah 'plate teoritis' dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain :

- konstruksi kolom,

- sifat solut yang dipisahkan,

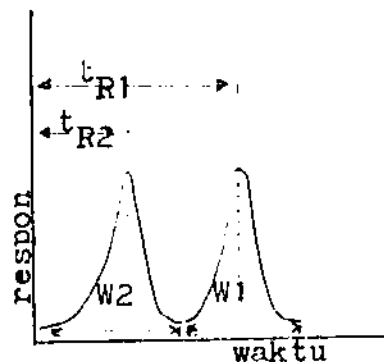
- kecepatan fase mobil (flow rate),

- temperatur,

- cara aplikasi sampel.

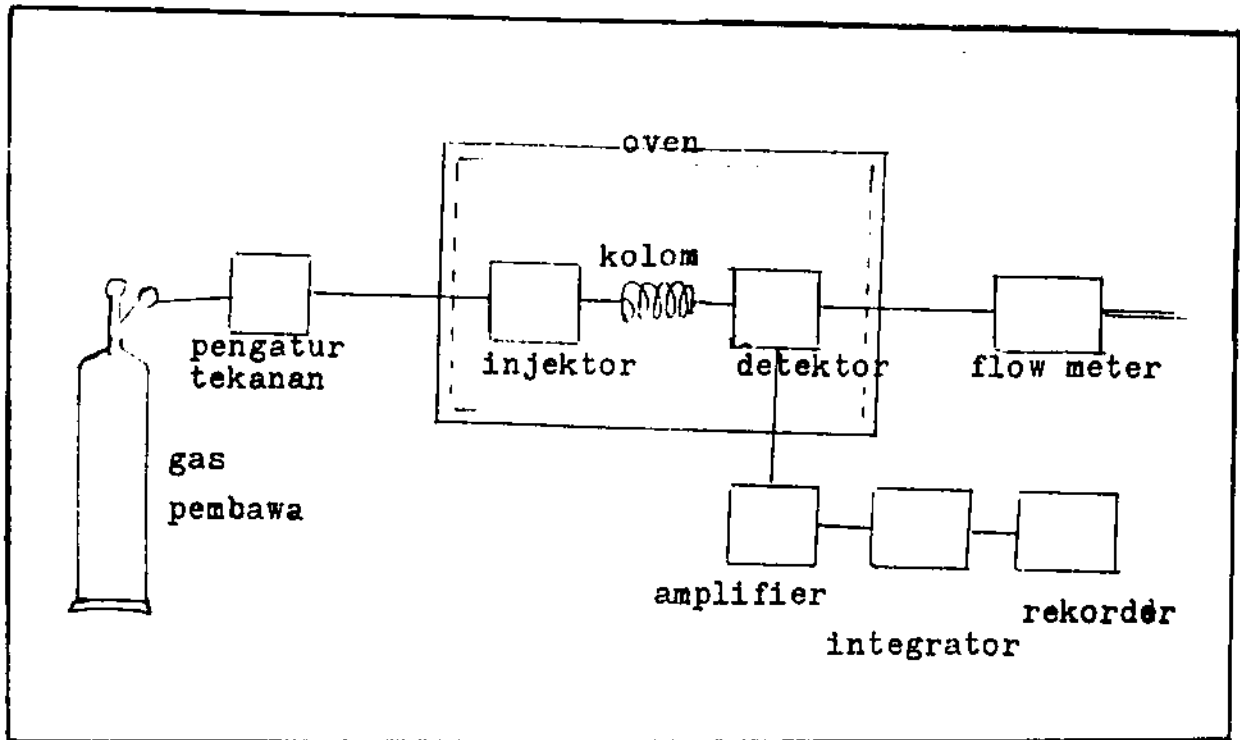
Bila campuran dua zat dipisahkan dengan kromatografi, maka derajat keterpisahan (resolusi/ R) dinyatakan dengan rumus

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$



Dalam praktek, parameter yang diamati adalah waktu retensi relatif yang diperoleh dengan membandingkan harga t_R dari komponen yang satu dengan yang lain atau

dengan pembanding. Berikut adalah diagram skematis alat kromatografi gas.



Gambar 10. Diagram skematis alat kromatografi gas

Pada sistem kromatografi gas, dikenal 3 (tiga) macam detektor yaitu :

- 'Flame Ionization Detector' (FID),
- 'Thermal Conductivity Detector' (TCD),
- 'Electrone Capture Detector' (ECD),

Prinsip dasar kerja dari masing-masing detektor secara ringkas bisa dijelaskan sebagai berikut :

- 'Flame Ionization Detector' (FID).

Bila suatu senyawa organik dibakar (dinyalakan), pada umumnya akan terionisasi dan dihasilkan elektron, sehingga mengakibatkan adanya aliran listrik yang

dapat diukur. Kepekaan sistem detektor ini dapat mencapai 10^{-10} gram. Air dan senyawa anorganik tidak memberikan respon terhadap FID.

- 'Thermal Conductivity Detector' (TCD)

Tahanan dari sebuah filamen yang dipanaskan, akan mengalami perubahan oleh karena adanya 'pendinginan'. Pendinginan tersebut akibat adanya solut dalam gas pembawa yang melewati filamen. Perubahan tahanan filamen tadi menimbulkan respon yang bisa diukur.

- 'Electrone Capture Detector' (ECD)

Prinsip kerja ECD hampir sama dengan FID; hanya digunakan untuk zat-zat dengan keelektronegatifan yang besar (suatu senyawa halogen, fosfor, nitrogen, dsbnya)

Pemilihan fase diam

Menurut Willard (46), fase diam harus memenuhi syarat : Menghasilkan harga K yang berbeda-beda untuk setiap komponen ; melarutkan komponen yang dipisahkan; tekanan uap yang dihasilkan pada suhu analisis tidak berpengaruh dan bersifat termostabil serta inert.

Untuk analisis steroid alami dapat digunakan fase diam selektif maupun non selektif (47). Fase diam non selektif yang banyak digunakan oleh para peneliti adalah polimer-polimer dari metil siloksan seperti SE-30, OV-1 dan OV-101 (48), sedangkan fase diam yang selektif misalnya QF-1 dan OV-17 (47).

Analisis dengan kolom kapiler lebih dianjurkan karena akan memberikan hasil pemisahan yang lebih baik

daripada kolom 'packed' (44). Namun penggunaan kolom logam sangat tidak dianjurkan karena dapat menyebabkan degradasi.

Untuk analisis steroid nabati kadang-kadang perlu dilakukan derivatisasi. Tujuan dari derivatisasi antara lain untuk mempercepat penguapan, memperoleh senyawa yang stabil, memperoleh pemisahan yang sempurna dan untuk identifikasi (46). Cara derivatisasi yang umum dilakukan adalah dengan sililasi, asetilasi, trifluorasetilasi dan oksimasi (48)

4.5. Identifikasi dengan HPLC.

Prinsip dasar mekanisme pemisahan pada HPLC sama dengan prinsip kromatografi kolom dan GC. Perbedaan pokoknya hanya terletak pada ukuran partikel fase diam yang jauh lebih kecil sehingga pada sistem diperlukan tekanan yang cukup tinggi, oleh karena permeabilitas cairan lebih rendah daripada gas.

Dibanding dengan sistem kromatografi yang lain, HPLC mempunyai beberapa keuntungan antara lain :

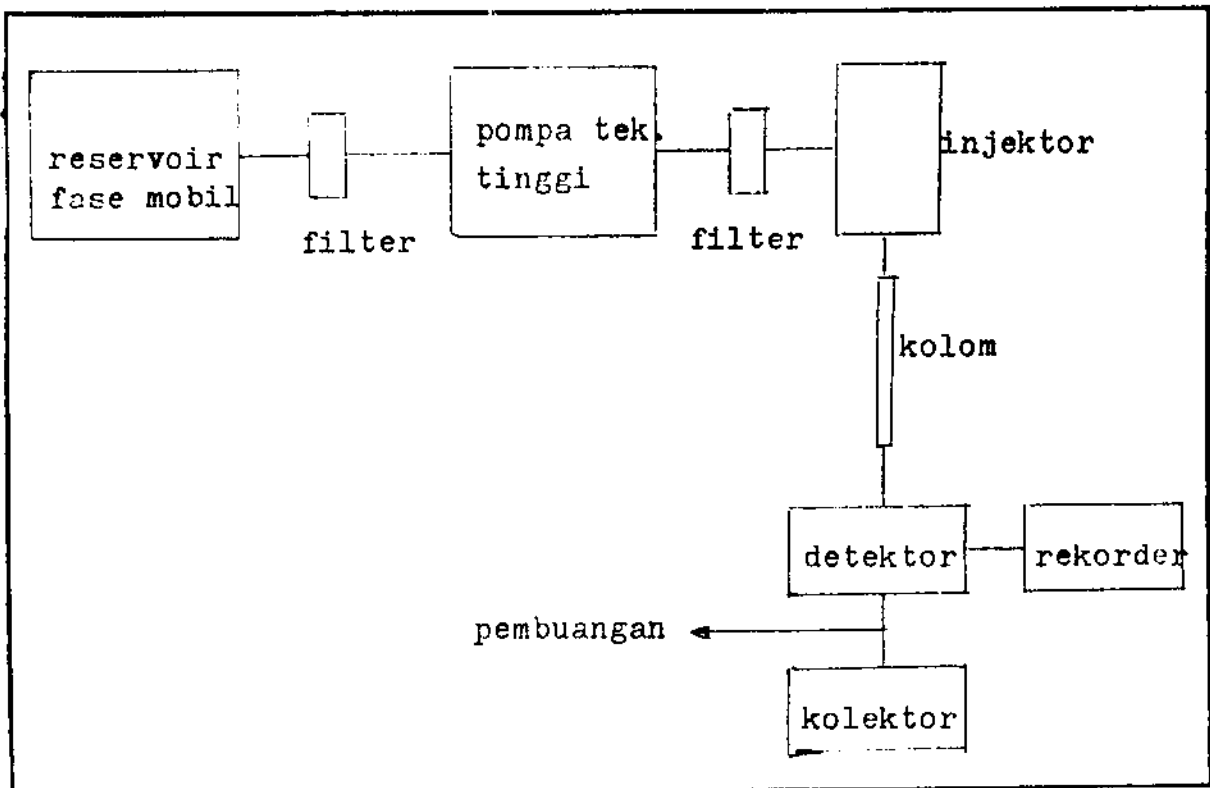
- kolom dapat digunakan berulang-ulang,
- pemisahan campuran lebih sempurna,
- reproduibilitas hasil sangat tinggi dan pengaruh oleh operator kecil,
- waktu analisis sangat singkat.

Bila dibandingkan dengan kromatografi gas, keuntungan HPLC adalah :

- dapat dilakukan pada suhu kamar,
- dapat digunakan macam-macam detektor,

- fase gerak bisa digunakan lagi setelah dimurnikan kembali.

Untuk pemilihan kondisi yang tepat perlu dipahami prinsip dasar cara kerja yang secara pendekatan teoritis telah diuraikan di atas. Oleh karena dalam praktek, parameter yang digunakan adalah t_R yang karakteristik tapi tidak spesifik untuk masing-masing senyawa, maka apabila identifikasi hanya dilakukan dengan HPLC, sebaiknya digunakan data dari berbagai kondisi (49). Berikut adalah diagram skematis dari hubungan peralatan HPLC.



Gambar 11.. Diagram skematis susunan peralatan HPLC

Pada analisa kuantitatif dengan HPLC dikenal 3 macam

metode (50) :

- metode eksternal

Pada cara ini mula-mula harus dibuat kurva kalibrasi dari zat standar. Kurva dibuat antara luas puncak (tinggi puncak) terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara menginterpolasikan pada grafik yang didapat.

Dengan cara ini seluruh tahapan analisa sampai saat injeksi harus distandarkan.

- metode internal

Pada cara ini baik pada sampel maupun pada standar ditambah suatu standar internal dengan konsentrasi tertentu. Kurva yang dibuat adalah antara rasio tinggi (area) puncak sampel/zat terhadap tinggi (area) puncak standar internal terhadap konsentrasi. Sebagai standar internal dipilih senyawa yang mempunyai sifat fisika dan kimia sama atau hampir sama dengan zat yang akan ditentukan dan mempunyai harga resolusi cukup baik pada proses analisa.

- metode adisi

Cara ini digunakan terutama bila kadar dalam sampel terlalu kecil sehingga sulit terdeteksi baik dengan cara eksternal maupun internal. Pada cara ini, terhadap sampel ditambahkan zat yang sama dengan zat yang akan ditentukan. Untuk ini diperlukan 3 konsentrasi yang berbeda. Kadar yang sesungguhnya diperoleh dengan cara ekstrapolasi (50).

Pemilihan solven

Pada umumnya, untuk senyawa-senyawa yang sering digunakan, sudah ada publikasi mengenai cara analisisnya dengan HPLC. Sehingga untuk analisa bisa dilakukan modifikasi sesuai dengan kondisi yang ada. Atau bisa dilakukan percobaan pendahuluan dengan cara analisis HPLC dengan kolom yang ada secara gradien MeOH/air (0 % - 100 %) selama 10-20 menit (50). Sehingga bisa diperkirakan campuran isokratis yang mempunyai harga k' (1-15). Banyak cara yang disarankan oleh para peneliti untuk optimasi solven misalnya cara dengan komputer dari Canales (51), cara dengan 'window diagram' dari Issaq (52) atau cara yang cukup sederhana dengan 'segitiga snyder' (53).

4.6. Identifikasi dengan GCMS.

Penggunaan kombinasi GCMS selain untuk menentukan struktur dari suatu senyawa, juga digunakan untuk tujuan identifikasi.

Pada spektrometri massa, molekul dibombardir dengan elektron berenergi tertentu menghasilkan partikel bermuatan positif. Molekul yang kehilangan satu elektron membentuk ion molekul atau ion induk, yang mengalami penecahan lebih lanjut menghasilkan ion pecahan dan molekul netral yang lebih kecil (46). Ion-ion tersebut dipisahkan berdasarkan harga perbandingan massa/muatan (m/e). Macam-macam cara ionisasi yang dikenal antara lain : 'electrone impact' (EI), 'chemical ionization' (CI),

'field ionization' (FI) dan lain-lain (46).

4.7. Identifikasi dengan spektrometri merah infra.

Bila molekul mengabsorpsi radiasi infra merah, maka energi yang diserap menyebabkan kenaikan amplitudo getaran atom, sehingga molekul berada pada keadaan vibrasi tereksitasi. Panjang gelombang eksak yang diserap oleh satu tipe ikatan tertentu tergantung dari macam getaran ikatan tersebut. Oleh karena itu setiap tipe ikatan yang berlainan akan menyerap radiasi infra merah pada panjang gelombang yang berbeda.

Spektrum infra merah adalah suatu grafik dari panjang gelombang yang secara berkesinambungan berubah sepanjang daerah spektrum infra merah terhadap persen transmisi (% T). Dalam keadaan ideal, bila tidak terjadi serapan infra merah oleh suatu molekul pada panjang gelombang tertentu, akan menunjukkan rekaman transmisi 100 % yang merupakan garis dasar (base line) dari suatu spektrum.

Bila terjadi serapan oleh suatu molekul pada panjang gelombang tertentu, akan mengakibatkan penurunan intensitas radiasi sehingga % transmisi yang terekam juga menurun. Penurunan ini terekam dalam bentuk pita absorpsi.

Dasar penafsiran spektrum infra merah adalah identifikasi pita absorpsi yang khas dari berbagai gugus fungsi. Misalnya gugus OH akan menimbulkan pita absorpsi kuat di daerah 3350 cm^{-1} .

Delapan daerah utama pada spektrum infra merah telah diketahui sebagai berikut (57) :

| Daerah spektrum | | Ikatan yang menyebabkan absorpsi |
|--------------------------------|---|--|
| Panjang gelombang (Mikrometer) | Bilangan gelombang (cm^{-1}) | |
| 2,7 - 3,3 | 3750 - 3000 | Regang O-H, N-H |
| 3,0 - 3,4 | 3300 - 2900 | -C \equiv C-H, C = C H, Ar-H, (regang C-H) |
| 3,3 - 3,7 | 3000 - 2700 | CH ₃ -, -CH ₂ -, $\overset{\text{O}}{\parallel}$ -C-H, C-H, (regang C-H) |
| 4,2 - 4,9 | 2400 - 2100 | Regang C \equiv C, C \equiv N |
| 5,3 - 6,1 | 1900 - 1650 | Regang C = O (asam, al - dehida, keton, amida, ester, anhidrida) |
| 5,9 - 6,2 | 1675 - 1500 | Regang C = C (alifa - tik dan aromatik , C = N- |
| 6,8 - 7,7 | 1475 - 1300 | Lentur $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C-H} \end{array}$ |
| 10,0 - 15,4 | 1000 - 650 | Lentur $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C} = \text{C-H} \end{array}$, Ar-H, (luar bidang) |

4.8. Identifikasi dengan spektrometri resonansi magnetik inti (¹H-NMR)

Pada analisis dengan H-NMR, senyawa steroid memberikan gambaran spesifik berupa adanya pita lebar di daerah 1 - 2,5 yang berasal dari multiplet proton ekivalen yang terdapat pada kerangka inti steroid. Disamping itu terdapat 2 buah puncak yang tajam diantara

0,6 dan 1,5 yang merupakan puncak dari gugus metil pada C-18 dan C-19. Pergeseran kimia yang terjadi sangat

dipengaruhi oleh substituen yang ada. Spektroskopi NMR juga dapat memberikan spektra spesifik untuk steroid sapogenin yaitu berupa perbedaan sinyal metil isomer C-20 dan C-25 (40).

BAB III

ALAT, BAHAN DAN METODE

1. Bahan

1.1. Bahan Kimia

Kecuali dinyatakan lain, semua bahan kimia yang digunakan adalah dengan derajat kemurnian 'pro analisa' produksi E Merck. Agar yang digunakan adalah Bacto Agar Difco Laboratories, Michigan USA. Hormon 2,4-D dan standar hekogenin serta sterol-sterol standar adalah produksi Sigma.

1.2. Bahan Percobaan

Sebagai bahan percobaan adalah kalus *Agave americana* yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

1.3. Media

Media yang digunakan adalah media Murashige & Skoog (MS) yang terdiri dari makroelemen, mikroelemen, vitamin, asam amino dan hormon pertumbuhan dari golongan auksin dan sitokinin. Komposisi media MS tertera pada lampiran 1. Pada penelitian ini dicoba berbagai komposisi hormon seperti tertera pada tabel 1 dengan tujuan untuk mencari pertumbuhan kalus yang tercepat.

2. Alat

- pH Meter Fieser Accumet model 230 A
- Otoklaf SMIC tipe WS2 - 84 - 64
- 'Laminar Air Flow Cabinet', Dalton model, San Ei Seisakusho, Ltd., type PCV-750-APG.
- Lempeng Kieselgel 60 F 254 (E Merck Darmstadt)
- Kromatografi gas type GC-9A Shimadzu
- Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) type LC 5 Shimadzu
- Jeol JMX - DX 303 GCMS
- JEOL FX 90 Q FT - NMR Spektroskopi
- Shimadzu 435 IR Spektroskopi
- Penggetar ultrasonik Julabo, type USR - 1
- Vortex
- Botol bermulut lebar untuk pembiakan kultur kalus
- Alat-alat gelas untuk pembuatan media
- Sterilset untuk pekerjaan aseptis

3. Metodologi

3.1. Penyiapan serbuk kalus sebagai bahan percobaan

3.1.1. Pembuatan kultur kalus

- Pembuatan media
- Kultivasi kalus
 - Sub kultur
 - Panen kalus

3.1.2. Pembuatan serbuk kalus

3.2. Isolasi dan identifikasi steroid dari kalus

3.2.1. Ekstraksi

3.2.2. Penisahan dan pemurnian

3.2.3. Identifikasi

4. Metode kerja

4.1. Penyiapan serbuk kalus sebagai bahan percobaan

4.1.1. Pembuatan kultur kalus

- Pembuatan media

Media yang digunakan adalah media MS (lampiran 1) dengan berbagai komposisi hormon kinetin dan 2,4-D seperti terlihat pada tabel 1 berikut :

Tabel 1. Macam-macam media yang dicoba untuk kultivasi kalus *Agave amaniensis*

Media dasar : MS

| Kode media | Kinetin (ppm) | 2,4-D (ppm) | Sukrosa (%) | Fosfat (mg/l) |
|------------|---------------|-------------|---------------|---------------|
| A | 1 | 1 | 3 | 170 |
| B | 3 | 1 | 3 | 170 |
| C | 5 | 1 | 3 | 170 |
| D | 7 | 1 | 3 | 170 |
| E | 5 | 0,50 | 3 | 170 |
| F | 5 | 0,25 | 3 | 170 |
| G | 5 | 1 | 1,5 | 170 |
| H | 5 | 1 | 6 | 170 |
| I | 5 | 1 | 3 | 85 |
| J | 5 | 1 | 3 | 340 |
| K | 5 | 1 | 3 | 42,5 |

Semua bahan kimia komponen media MS dibuat dan disimpan dalam bentuk larutan stok, kecuali mio-inositol, sukrosa dan agar. Dalam penelitian ini digunakan agar dengan konsentrasi 0,7% b/v serta penambahan hormon kinetin dan 2,4-D seperti tertera pada tabel 1. Pembuatan media ini sesuai dengan metode dari Murashige & Skoog. Masing-masing larutan stok diambil dalam konsentrasi yang sesuai dicampur jadi satu, kemudian ditambah mio-inositol, dan sukrosa, pH media dibuat 5,7 dengan penambahan larutan NaOH 0,1 N atau larutan HCL 0,1 N. Selanjutnya ditambahkan agar, lalu dipanaskan sambil diaduk terus sampai jernih.

Larutan media ini dituang panas-panas kedalam botol kultur sebanyak kurang lebih 25 ml per botol, ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam otoklaf 121° C selama 20 menit.

Sebelum digunakan untuk kultivasi kalus, media steril disimpan dalam ruang kultur yang bersuhu $\pm 25^{\circ} \text{C}$.

Untuk lebih jelasnya, pembuatan media tersebut diatas dapat dilihat pada skema yang tertera pada lampiran 2.

- Kultivasi kalus

Untuk peneliharaan dan perbanyakan kultur kalus dilakukan subkultur yaitu kalus dari satu botol kultur dipindahkan ke beberapa media segar (56). Pekerjaan tersebut dilakukan secara aseptis dalam "laminar air flow cabinet". Tahapan ini perlu dilakukan untuk memperoleh kalus dalam jumlah yang cukup sebagai bahan percobaan. Kalus yang dipilih adalah kalus yang tumbuh dengan tekstur yang cukup kompak atau rapuh dan tidak mengalami pencoklatan, berwarna kuning kehijauan. Parameter pertumbuhan kalus dinyatakan dengan Indeks Pertumbuhan (IP) yaitu perbandingan prosentase bobot akhir kalus pada saat panen terhadap bobot awal kalus pada saat penanaman. Atau dinyatakan dengan rumus:

$$IP = \frac{\text{bobot akhir kalus}}{\text{bobot awal kalus}} \times 100 \%$$

Dalam penelitian ini dipilih kalus yang tumbuh tercepat yaitu yang mempunyai harga IP terbesar dengan kriteria tekstur seperti tersebut diatas.

Panen dilakukan terhadap kalus yang sudah berumur 6 minggu dengan cara memisahkan kalus dari agar yang menempel kemudian ditimbang.

4.1.2. Pembuatan serbuk kalus

Untuk bahan isolasi, kalus hasil panen tersebut dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C - 60°C, diserbuk dan dihomogenkan.

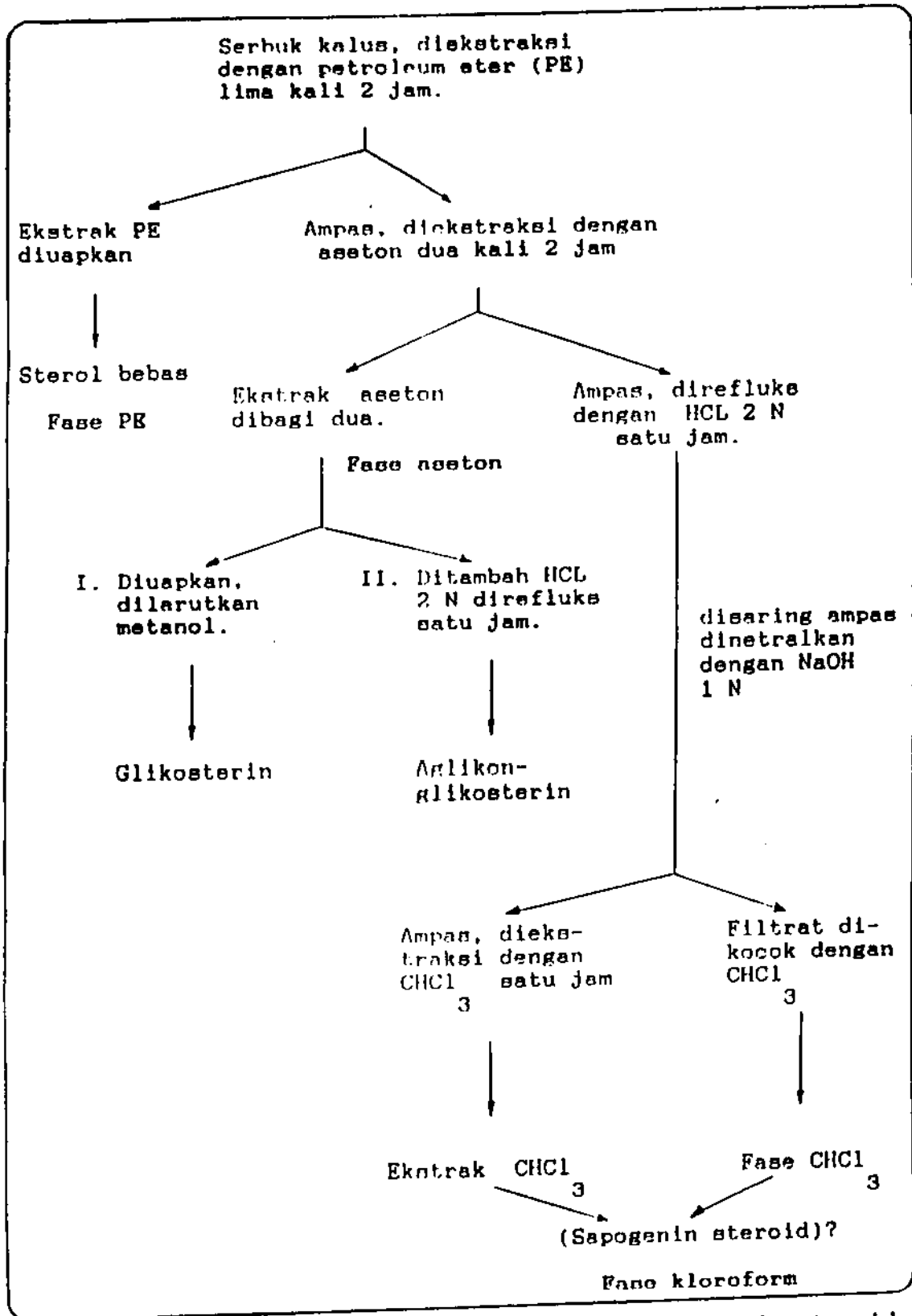
4.2. Isolasi dan identifikasi steroid dari kalus *Agave amaniensis*

4.2.1. Ekstraksi

Serbuk kalus kering ditimbang sejumlah tertentu, direfluks lima kali selama dua jam dengan petroleum eter 40-60 pada penangas air. Setelah disaring, filtrat dipisahkan dan ampas direfluks tiga kali selama dua jam dengan aseton pada suhu 80°C - 85°C.

Fase aseton dibagi dua. Salah satu dari bagian tersebut dihidrolisis dengan HCL 2 N pada suhu 100°C selama satu jam. Ampas dari fase aseton ini juga dihidrolisis dengan HCL 2 N pada suhu 100°C selama satu jam. Setelah disaring, ampas dicuci dengan air suling sampai netral, kemudian ditambah dengan NaOH 1 N dan dicuci lagi dengan air suling. Kertas saring bersama-sama ampas, setelah dikeringkan dalam almari pengering pada suhu \pm 50°C, direfluks tiga kali selama dua jam dengan kloroform. Filtrat diekstraksi tiga kali dengan kloroform. Fase kloroform ini dikumpulkan.

Selanjutnya terhadap masing-masing fase dilakukan deteksi, pemisahan dan pemurnian



Gambar 12 Prosedur skematis ekstraksi steroid dari kalus *Agave americana*

diosgenin untuk sapogenin steroid dan solasodin untuk alkaloid steroid.

4.2.3. Pemisahan dan pemurnian dengan kromatografi kolom

Berdasarkan hasil KLT, maka untuk ekstrak petroleum eter digunakan pelarut n-heksana: etil asetat (4 : 1) dan fase diam kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM) khusus untuk kromatografi kolom. Fase diam dimasukkan kedalam kolom gelas dengan cara disuspensikan dalam pelarut (fase gerak) kemudian dituang kedalam kolom dan selama penuangan, aliran pelarut dalam keadaan terbuka. Setelah semua fase diam didalam kolom, maka kolom fase diam tersebut didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya ekstrak kental yang akan dipisahkan seberat tertentu dilarutkan kedalam pelarut yang akan digunakan, kemudian dituang dalam fase diam. Dengan kecepatan tertentu eluat ditampung dalam vial-vial/ tabung reaksi masing-masing sekitar 2 ml sampai 5 ml. Eluat hasil kolom diamati dengan cara KLT. Selanjutnya, untuk hasil yang sama dicampur jadi satu untuk dilakukan analisis lanjutan ataupun dilakukan rekristalisasi. Elusi dihentikan setelah fraksi dites dengan KLT tidak terlihat bercak noda.

Untuk ekstrak kloroform dilakukan elusi dengan fase gerak kloroform : etil asetat

gradien mulai dari 19 : 1, 18 : 2 sampai dengan 14 : 6. Fase diam yang digunakan serta cara perlakuannya sama dengan diatas.

4.2.4. Identifikasi steroid dengan kromatografi gas

Untuk fraksi yang memberikan hasil positif dengan KLT, analisis dilanjutkan dengan kromatografi gas GC-9A Shimadzu yang dilengkapi dengan prosesor data C-R3A. Gas pembawa yang digunakan adalah Nitrogen (N₂). dengan kecepatan aliran 40 ml/ menit, suhu kolom 220° - 280° C : 5°/ menit, suhu detektor 280° C. Detektor yang digunakan adalah FID (Flame Ionised Detektor). Panjang kolom gelas pack 3 meter dengan diameter 0,3 mm, diisi OV-101 5% pada 'Chromosorb W' (kondisi percobaan I). Juga dicoba dengan kolom kapiler FS-WCOT Gasukoro Kogyo panjang 25 m dengan diameter 0,25 mm, suhu kolom isothermal 260° C, suhu injektor 270° C dengan detektor sama yaitu FID (kondisi percobaan II). Dengan membandingkan waktu retensi relatif antara pambanding dengan sampel, maka dapat diketahui komponen steroid dalam ekstrak yang dianalisis (48).

4.2.5. Identifikasi dengan HPLC

- Analisis kualitatif

Analisis dengan HPLC dilakukan terhadap fraksi sterol dari fase petroleum eter

menggunakan fase gerak Metanol : Air 99 : 1 dengan kolom ODS Zorbax (55); suhu kolom 40° C, kecepatan aliran 1 ml/menit dengan detektor uv-vis 205 nm (kondisi percobaan I). Analisis dilakukan dengan cara eksternal dan internal. Pembanding yang digunakan adalah campuran kolesterol, stigmasterol dan sitosterol serta diosgenin standar untuk cara internal.

- Analisis kuantitatif

Pada analisis kuantitatif dengan standar eksternal, mula-mula dibuat kurva linier dari satu seri larutan standar yang konsentrasinya mendekati larutan sampel. Pada percobaan ini dibuat larutan seri standar dengan konsentrasi 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,25 mg/ml dan 0,3 mg/ml. Kurva dibuat antara luas puncak berbanding konsentrasi. Analisis kuantitatif dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar sterol bebas dan sterol total.

Penyiapan sampel dilakukan sebagai berikut :

Cara I

- Serbuk kalus kering sebanyak 1 gram diekstraksi dengan kloroform 10 ml dengan menggunakan alat pengocok vortex selama 3

kali 5 menit (sampai bebas sterol), disaring. Filtrat dikeringkan dengan rotavapor, setelah kering dilarutkan dalam metanol HPLC sebanyak 1 ml (disebut cuplikan I yang mengandung sterol bebas). Kemudian dianalisis dengan kondisi percobaan I seperti tersebut diatas.

Cara II

- Serbuk kalus kering sebanyak 1 gram langsung direfluks dengan HCl 2N 10 ml selama 1 jam. Setelah dinetralkan dengan NaOH, dikocok dengan kloroform sebanyak 50 ml. Hasil ekstraksi ini dikeringkan dengan rotavapor. Setelah kering dilarutkan dengan 1 ml metanol HPLC dan dianalisis sebagai cuplikan II yang mengandung sterol total.

Perhitungan estimasi kadar dilakukan terhadap kolesterol standar dengan cara perhitungan perbandingan luas area antara puncak-puncak pada sampel dengan standar pada waktu retensi yang sama.

Contoh perhitungan bisa dilihat pada lampiran 3

4.2.6. Identifikasi steroid dengan GC/MS

Untuk memastikan komponen steroid sesuai dengan puncak-puncak dalam kromatogram hasil kromatografi gas maupun HPLC, maka dilakukan

analisis dengan GC/MS. Pada percobaan ini, hasil isolat fraksi sterol dari fase petroleum eter dianalisis dengan JEOL DX-303 GCMS. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium (He) dengan kecepatan aliran 1 ml/ menit. Suhu kolom isothermal 220° C. Jenis kolom adalah Fused Silica Kapillar Saule FS OV - 17 (katalog MN-3320-52) panjang 10 m dengan diameter 0,32 mm. Dengan energi ionisasi cara 'Electrone Impact' (EI), kekuatan arus sebesar 70 eV.

4.2.7. Identifikasi isolat dengan spektrometri merah infra

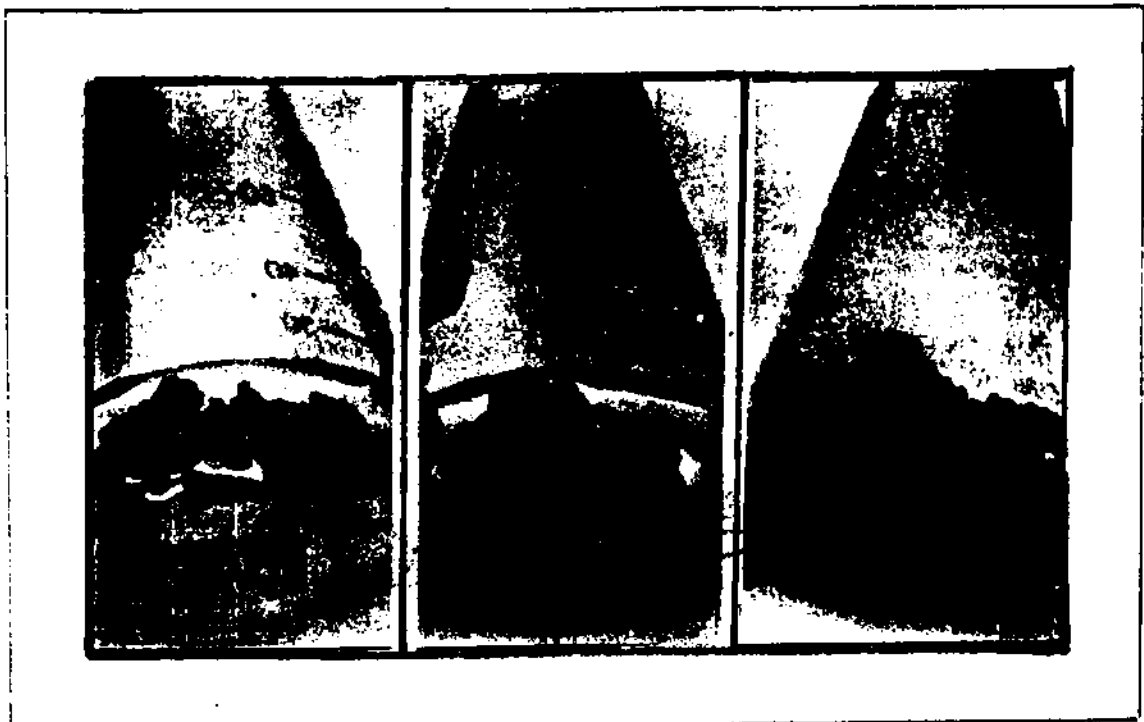
Hasil isolat dari fase kloroform dibentuk pelet dengan KBr kemudian dikompresi dengan kekuatan 8 ton. Pelet yang dihasilkan diletakkan dalam tempat sampel; scanning dilakukan mulai 400 nm sampai dengan 4000 nm

BAB IV

HASIL PENELITIAN

1. Kultivasi kalus

Kalus sebagai bahan percobaan seperti terlihat pada gambar 14. Macam-macam komposisi media dan hasil perhitungan ideks pertumbuhan untuk masing-masing media yang dicoba bisa dilihat pada tabel 2.



Gambar 14. Kalus *Agave amaniensis* pada media MS dengan penambahan hormon kinetin 5 ppm dan 2,4-D 0,5 ppm.

Keterangan : A. Kalus setelah penanaman 3 hari
B. Kalus setelah penanaman 2 minggu
C. Kalus setelah penanaman 3 minggu

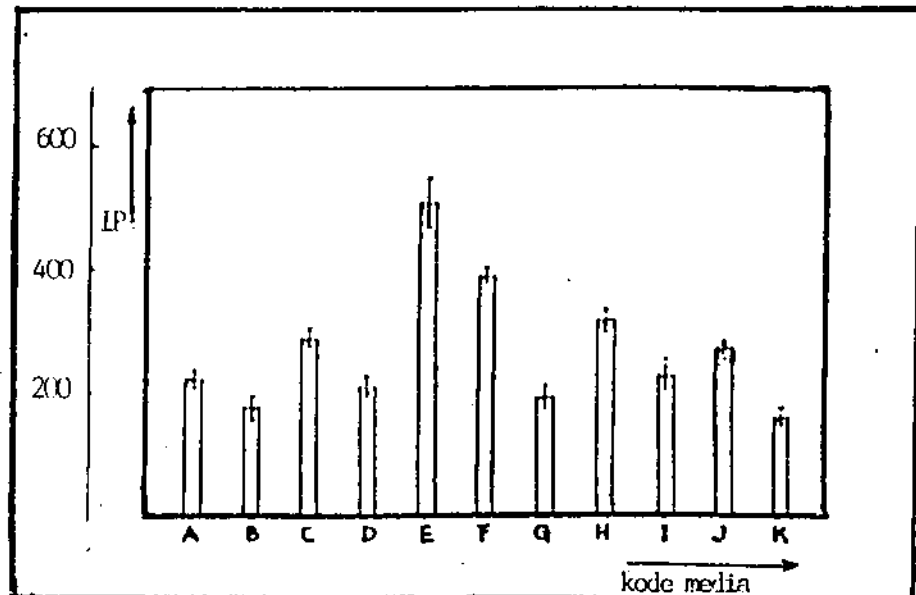
Tabel 2. Hasil Perhitungan Indeks Pertumbuhan (IP) rata-rata dari kalus *Agave amaniensis* umur 6 minggu pada masing-masing media yang dicoba. Replikasi dilakukan terhadap 7 s/d 13 botol.

| Kode med. | kin. (ppm) | 2,4-D (ppm) | sukr. (%) | fosp. (mg/l) | IP ($\bar{X} \pm SD$) |
|-----------|------------|-------------|-----------|--------------|-------------------------|
| A | 1 | 1 | 3 | 170 | 314,78 \pm 4,83 |
| B | 3 | 1 | 3 | 170 | 176,51 \pm 14,53 |
| C | 3 | 1 | 3 | 170 | 282,62 \pm 13,02 |
| D | 7 | 1 | 3 | 170 | 211,33 \pm 11,16 |
| E | 3 | 0,5 | 3 | 170 | 510,94 \pm 42,43 |
| F | 3 | 0,25 | 3 | 170 | 389,39 \pm 10,95 |
| G | 3 | 1 | 1,5 | 170 | 391,69 \pm 20,57 |
| H | 3 | 1 | 6 | 170 | 318,30 \pm 11,91 |
| I | 3 | 1 | 3 | 85 | 213,40 \pm 26,8 |
| J | 3 | 1 | 3 | 340 | 270,54 \pm 5,7 |
| K | 3 | 1 | 3 | 42,5 | 158,63 \pm 8,6 |

n: 7 s/d 13

Keterangan

kin : hormon kinetin
 2,4-D : hormon 2,4-D
 sukrr : sukrosa
 fospf : ion fosfat dalam bentuk KH_2PO_4
 IP : Indeks Pertumbuhan



Gambar 15. Histogram profil kecepatan pertumbuhan kalus *Agave amaniensis* umur 6 minggu pada berbagai media yang dicoba.

2 . Isolasi dan Identifikasi steroid dari kalus

2.1. Ekstraksi dan identifikasi steroid dari kalus

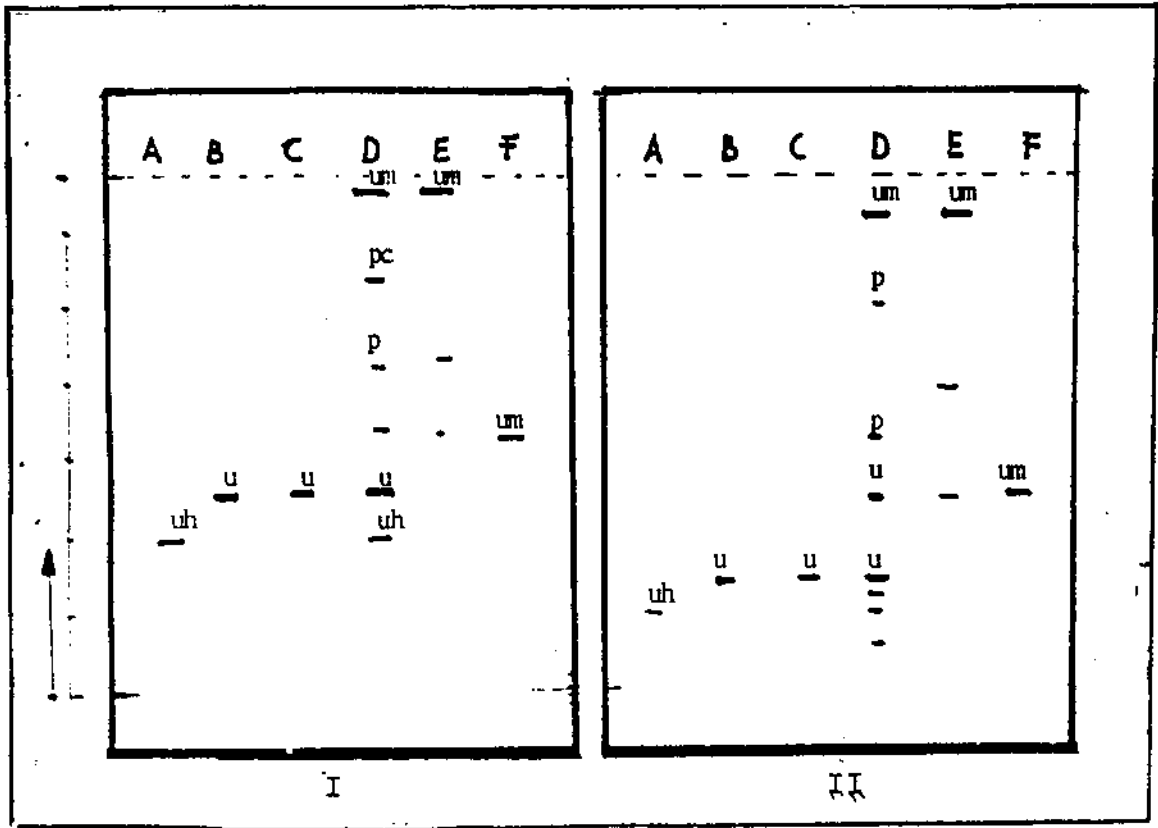
Dari ekstraksi, didapat fase petroleum eter, fase aseton dan fase kloroform. Terhadap masing-masing fase dilakukan identifikasi pendahuluan dengan KLT. Profil hasil KLT dari masing-masing fase terlihat pada gambar 16 ; gambar 17, dan gambar 18.

2.2. Pemisahan dengan kromatografi kolom

Berdasar hasil KLT, terhadap masing-masing fase dilakukan kromatografi kolom. Profil kromatogram hasil pemisahan untuk masing-masing fase pada lempeng kieselgel 60 F254 terlihat pada gambar 19 dan gambar 20.

2.3. Identifikasi dengan kromatografi gas

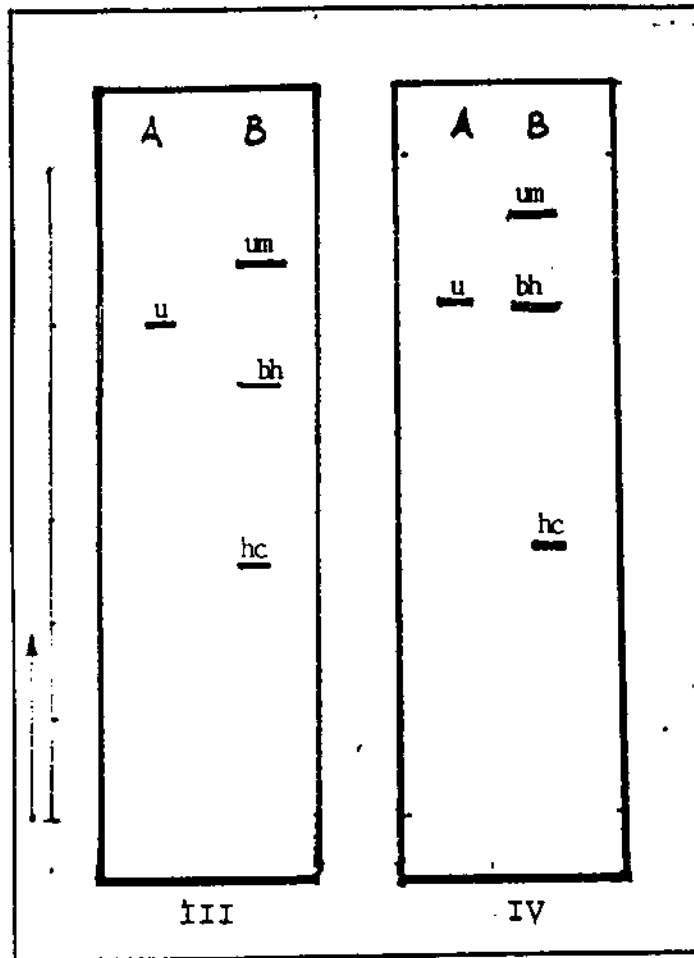
Terhadap masing-masing fraksi hasil dari kromatografi kolom fase petroleum eter (gambar 19) dianalisis dengan kromatografi gas. Profil kromatogram dari fraksi I dan II terlihat pada gambar 21 dan gambar 22. Untuk fraksi III dilakukan analisis menggunakan dua kondisi percobaan yaitu dengan menggunakan kolom 'packed' dan kolom kapiler. Profil kromatogram dari fraksi III terlihat pada gambar 23.



Gambar 16. Profil kromatogram KLT fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* pada kieselgel 60 F254 dengan fase gerak n-heksan : etilasetat 4 : 1 (I) dan n-heksan : kloroform 1 : 4 (II) serta penampak bercak anisaldehyd sulfat.

Keterangan : A. pembanding betulin dari Universitas Tübingen
 B. pembanding stigmasterol Sigma
 C. pembanding sitosterol Sigma
 D. fase PE ekstrak kalus *Agave amaniensis*.
 E. pembanding skualen Sigma
 F. pembanding lupeol dari Laboratorium Fitokimia FFUA

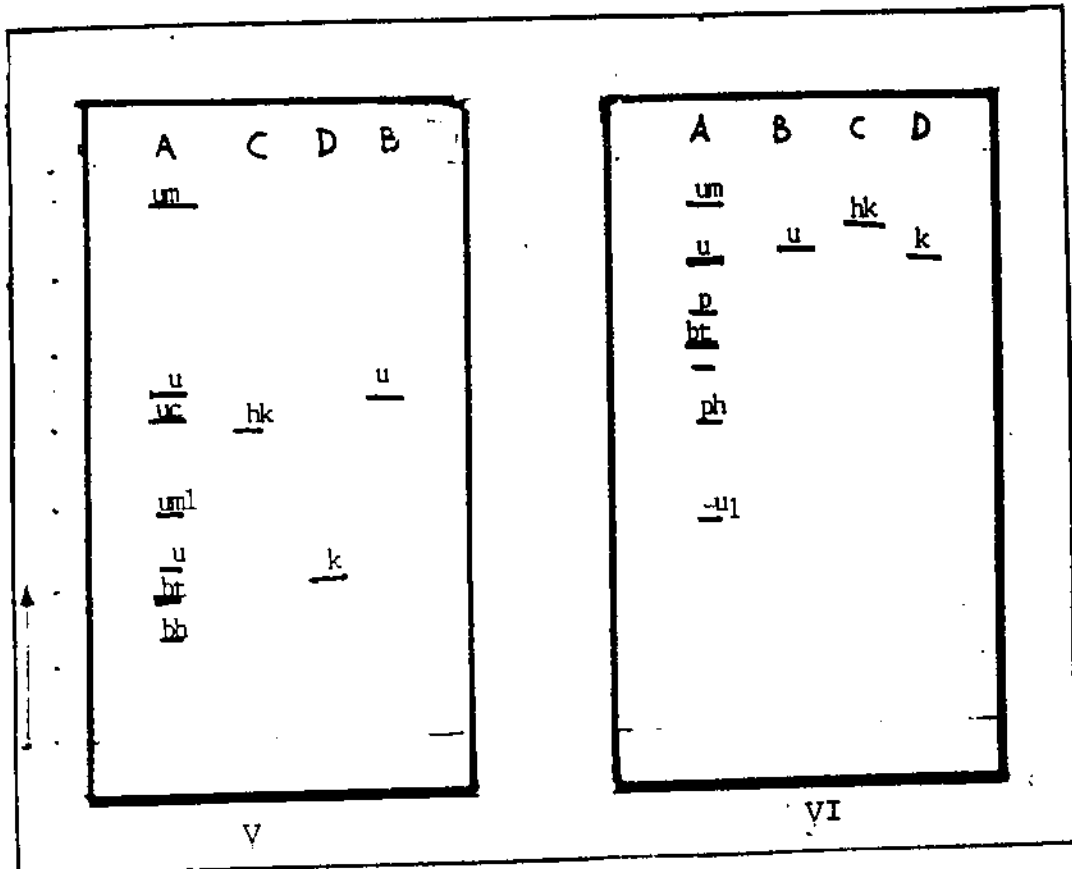
Warna bercak : p = pink
 pc = pink kecoklatan
 u = ungu
 uh = ungu kehijauan
 um = ungu kemerahan



Gambar 17. Profil kromatogram KLT fasem aseton dari ekstrak kalus *Agave amaniensis* pada kieselgel 60 F254 dengan fase gerak kloroform : metanol 6 : 1 (III) dan benzen : etil asetat 1 : 1 (IV) serta penampak bercak anisaldehyd sulfat.

Keterangan :
 A. pembanding stigmasterol Sigma
 B. fase aseton dari ekstrak kalus *Agave amaniensis*.

Warna bercak :
 bh = biru kehijauan
 hc = hijau kecoklatan
 u = ungu
 um = ungu kemerahan



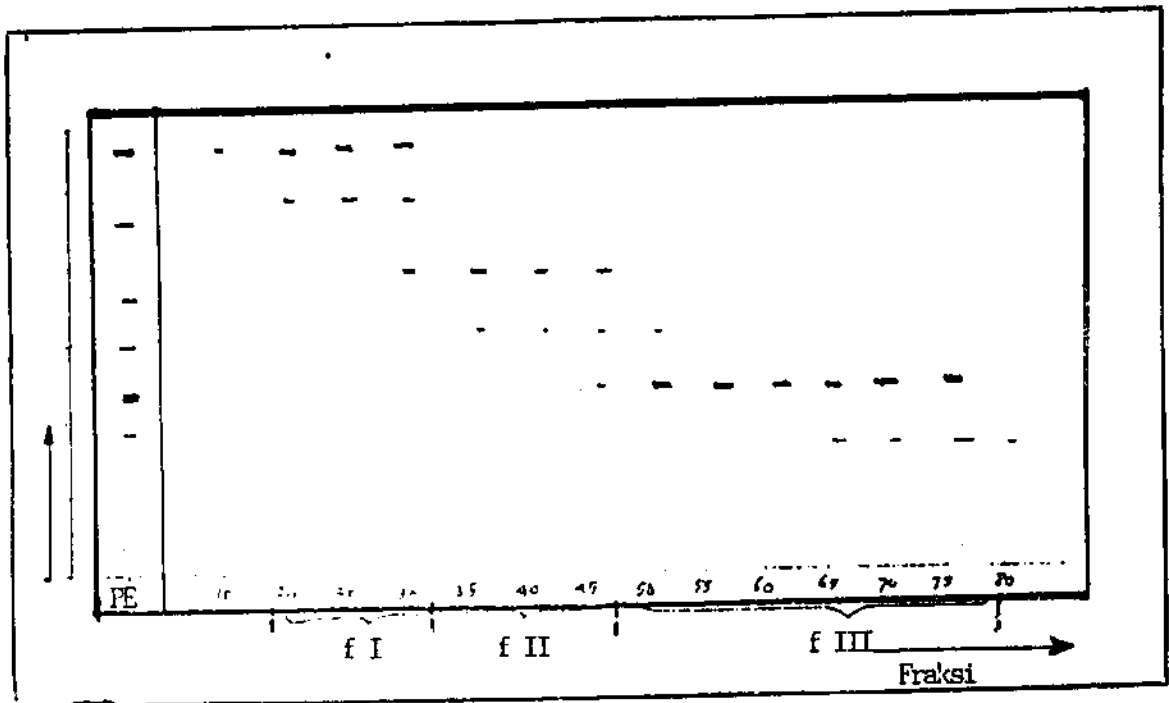
Gambar 18. Profil kromatogram KLT fase kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis* pada kieselgel 60 F254 dengan eluen kloroform : etil asetat 9 : 1 (V) dan kloroform : metanol 19 : 3 (VI) serta penampak bercak anisaldehyd sulfat.

Keterangan :

- A. fase kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis*.
- B. pembanding sitosterol Sigma
- C. pembanding diosgenin Sigma
- D. pembanding hekogenin Sigma

Warna bercak :

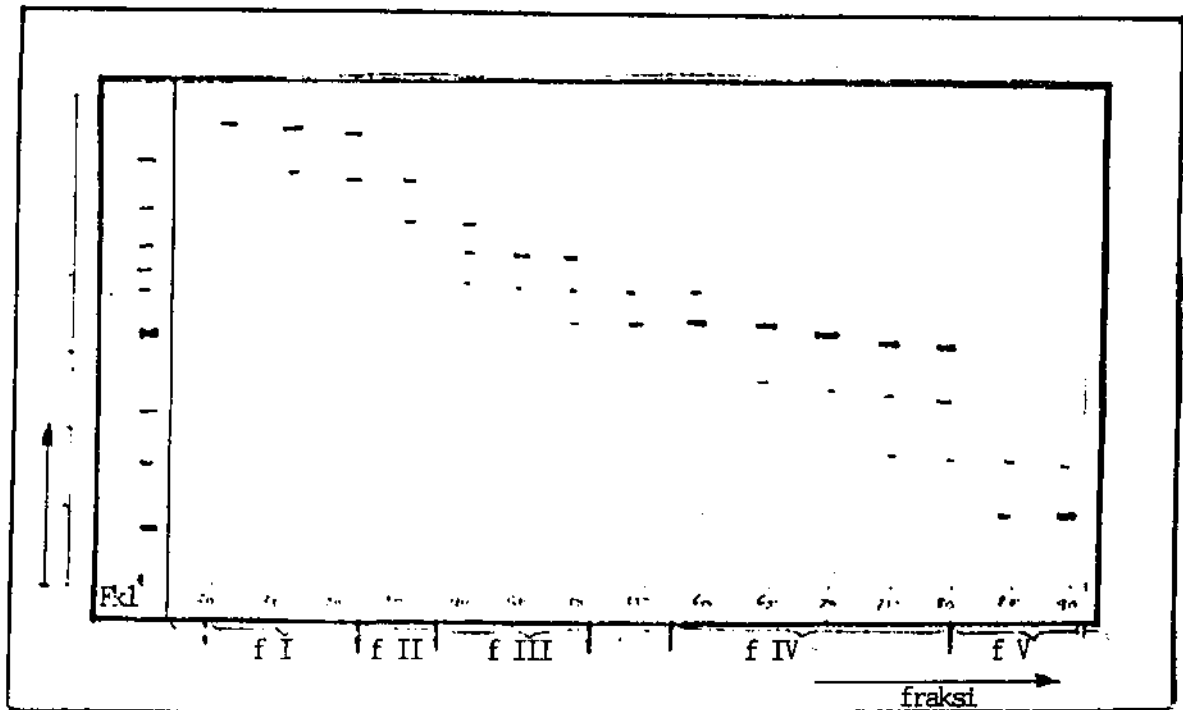
- bh = biru kehijauan
- bt = biru toska
- hk = hijau kekuningan
- k = kuning
- p = pink
- ph = pink kehijauan
- u = ungu
- um = ungu kemerahan
- um1 = ungu kemerahan lemah
- u1 = ungu lemah



Gambar 19. Profil kromatogram KLT hasil pemisahan dengan kromatografi kolom fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* pada lempeng kieselgel 60 F254 dengan fase gerak n-heksan : etil asetat 4 : 1, penampak bercak asam sulfat 50 % dalam metanol.

Keterangan

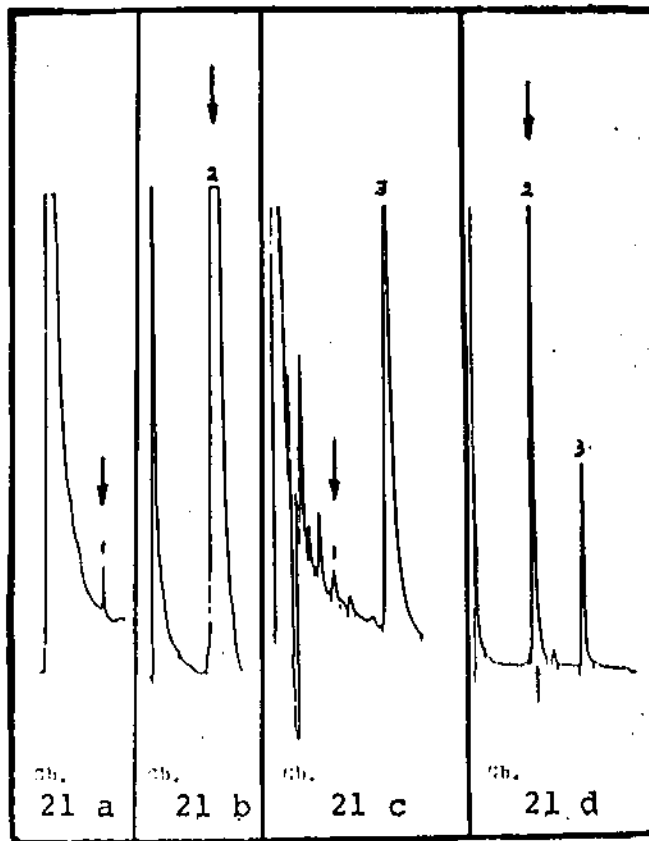
PE : fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis*
 F.1 : fraksi I (fraksi no.20 s/d no.32)
 F.2 : fraksi II (fraksi no.33 s/d no.47)
 F.3 : fraksi III (fraksi no.48 s/d no.80)



Gambar 20 . Profil kromatogram KLT hasil pemisahan dengan kromatografi kolom fase kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis* pada lempeng kieselgel 60 F254 dengan fase gerak gradien kloroform : etil asetat 19 : 1 s/d 14 : 6, penampak bercak asam sulfat 50 % dalam metanol.

Keterangan

Fkl. : fase kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis*.
 F I : fraksi I (fraksi no. 20 s/d 33)
 F II : fraksi II (fraksi no. 34 s/d 38)
 F III : fraksi III (fraksi no. 39 s/d 50)
 F IV : fraksi IV (fraksi no. 57 s/d 80)
 F V : fraksi V (fraksi no. 81 s/d 117).



- Gambar 21 a. Profil kromatogram GC fraksi I fase petroleum eter dari ekstrak kalus *Agave amaniensis* (kondisi percobaan I).
- b. Profil kromatogram GC skualen standar (kondisi percobaan I)
- c. Profil kromatogram GC fraksi I fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* dengan kolesterol sebagai standar internal (kondisi percobaan II)
- d. Profil kromatogram skualen standar dengan kolesterol sebagai standar internal (kondisi percobaan II)

Tabel 3. Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 21)

| Gambar | kode puncak | Rt (menit) | RRt* | Keterangan |
|--------|-------------|------------|------|------------------------|
| 21 a | 1 | 9,70 | | 1 = skualen standar |
| 21 b | 1 | 9,80 | | 1' = skualen sampel |
| 21 c | 1 | 9,60 | 1,80 | 3 = kolesterol standar |
| | 3 | 17,40 | 1,00 | |
| 21 d | 1 | 9,60 | 1,77 | |
| | 3 | 17,04 | 1,00 | |

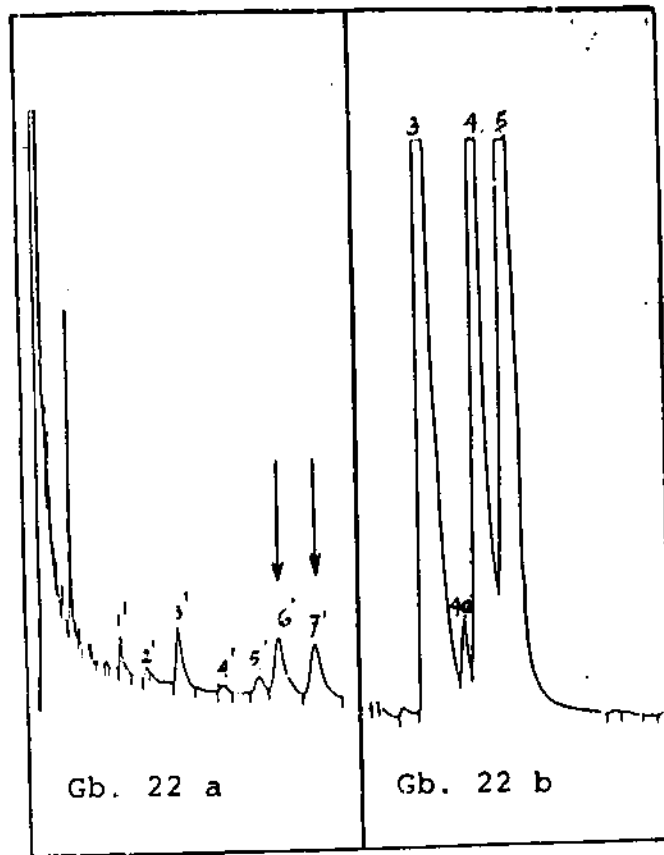
* waktu retensi relatif

kondisi percobaan I

kolom : chromosorb AW-DMCS shi-
madzu OV-101 5 % pack.
3m X 0,3 mm
suhu kolom : 220° C - 280° C; 5°/mnt
suhu injek.: 280° C
detektor : FID /280° C

kondisi percobaan II

kolom : FS-WCOT Gasukuro Kogyo Capillair
25m x 0,25 mm
suhu kolom : 260° C isothermal
suhu injek : 270° C
detektor : FID /270° C



Gambar 22 a : Profil kromatogram GC fraksi II dari fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis*.

b : Profil kromatogram GC campuran sterol standar (kolesterol, campesterol, stigmasterol dan sitosterol).

Tabel 4. Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 22).

| Gambar a | | | Gambar b | | |
|-------------|------------|------|----------------|------------|------|
| kode puncak | Rt (menit) | RRt* | kode puncak | Rt (menit) | RRt* |
| 1' | 9,80 | | | | |
| 2' | 13,10 | | | | |
| 3' | 16,70 | 1,00 | 3 | 16,50 | 1,00 |
| | | | 4 _a | 20,30 | |
| 4' | 21,60 | 1,30 | 4 | 22,20 | 1,30 |
| 5' | 25,80 | 1,50 | 5 | 25,80 | 1,50 |
| 6' | 27,90 | 1,70 | | | |
| 7' | 31,90 | 1,90 | | | |

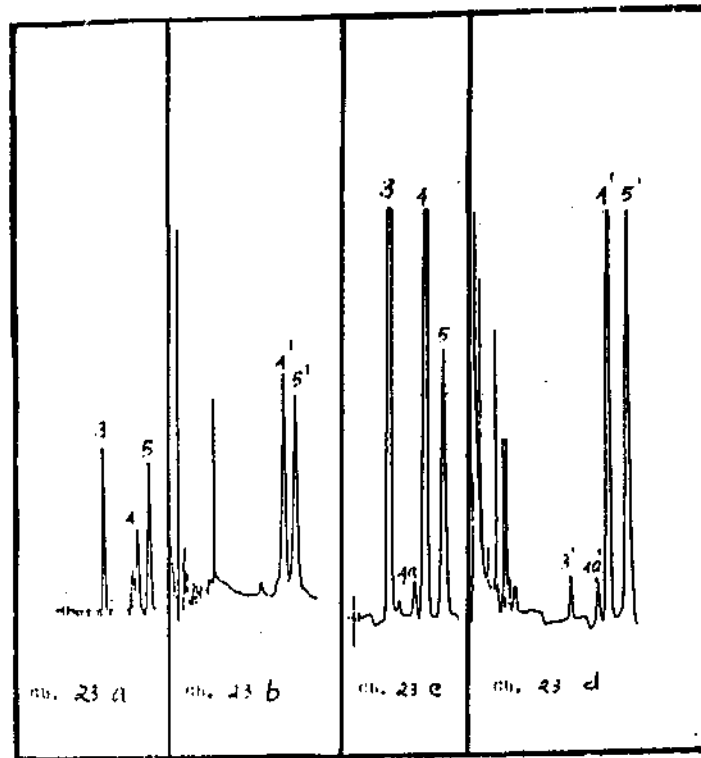
* waktu retensi relatif

Keterangan

- 3 = kolesterol standar
- 3' = kolesterol sampel
- 4_a = kampesterol
- 4 = stigmasterol standar
- 4' = stigmasterol sampel
- 5 = sitosterol

kondisi percobaan

kolom : FS-WCOT Gasukuro Kogyo Capillair
 25 m X 0,25 mm
 suhu kolom : 260° C isothermal
 suhu injektor: 270° C
 detektor : FID /270° C



Gambar 23 a. Profil kromatogram GC campuran kolesterol, stigmasterol dan sitosterol standar (kondisi percobaan I)

b. Profil kromatogram GC fraksi III dari fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* (kondisi percobaan I)

c. Profil kromatogram GC campuran kolesterol, stigmasterol dan sitosterol standar (kondisi percobaan II)

d. Profil kromatogram GC fraksi III dari fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* (kondisi percobaan II).

Tabel 5. Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram GC (gambar 23)

| Gb. 23 a | | | Gb. 23 b | | | Gb. 23 c | | | Gb. 23 d | | |
|-----------|------|-------------|-----------|------|-------------|-----------|------|-------------|-----------|------|-------------|
| Rt. menit | RRT* | kode puncak | Rt. menit | RRT* | kode puncak | Rt. menit | RRT* | kode puncak | Rt. menit | RRT* | kode puncak |
| 30,6 | | 3 | | | | 17,8 | 1 | 3 | 17,3 | 1 | 3' |
| | | | | | | 22,2 | 1,2 | 4a | 21,9 | 1,2 | 4a' |
| 38,3 | 1 | 4 | 38,2 | 1 | 4' | 24,1 | 1,3 | 4 | 23,7 | 1,3 | 4' |
| 42,5 | 1,1 | 5 | 42,2 | 1,1 | 5' | 27,2 | 1,5 | 5 | 26,9 | 1,5 | 5' |

* waktu retensi relatif

- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 3 = kolesterol | 4 = stigmasterol |
| 3' = kolesterol sampel | 4a = kampesterol |
| 5 = sitosterol | 4a' = kampesterol sampel |
| 5' = sitosterol sampel | 4' = stigmasterol sampel |

kondisi percobaan I

kolom : chromosorb AW-DMCS shimadzu OV-101 5 % pack.
 3m X 0,3 mm
 suhu kolom : 220°C - 280°C; 5°/mnt
 suhu injek.: 280°C
 detektor : FID / 280°C

kondisi percobaan II

kolom : FS-WCOT Gasukuro Kogyo Capillair
 25m x 0,25 mm
 suhu kolom : 260°C isothermal
 suhu injek : 270°C
 detektor : FID / 270°C

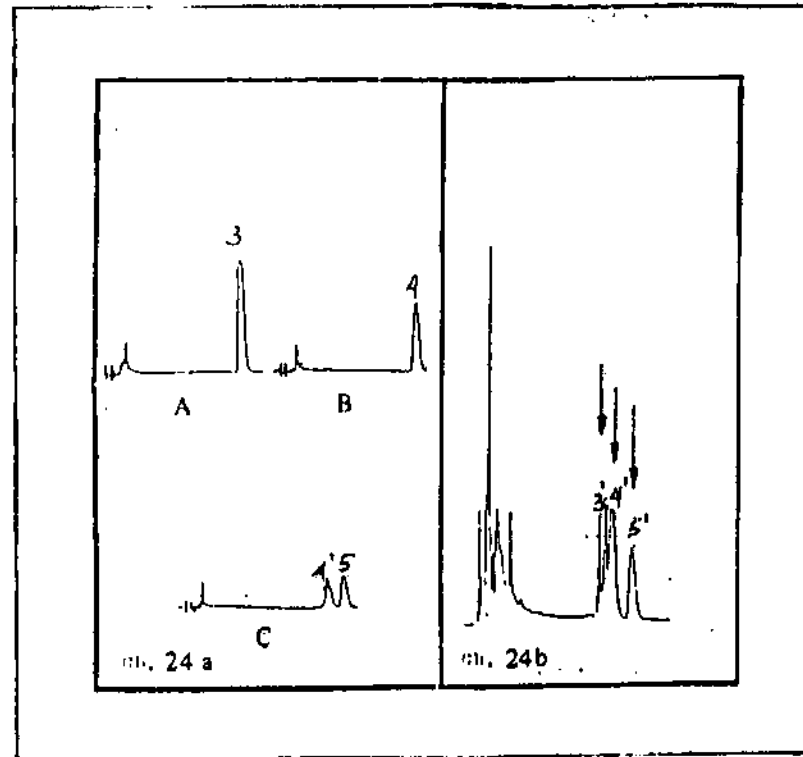
2.4. Identifikasi dengan HPLC

2.4.1. Analisis kualitatif

Profil kromatogram HPLC dari fraksi III fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* dengan menggunakan standar eksternal bisa dilihat pada gambar 24a dan gambar 24b, sedangkan yang menggunakan standar internal terlihat pada gambar 25a dan gambar 25b.

2.4.2. Analisa kuantitatif

Profil kromatogram HPLC kuantitatif cuplikan I (bab III, halaman 46) terlihat pada gambar 32. Estimasi kadar dihitung berdasarkan perbandingan antara luas puncak area sampel dengan standar. Hubungan antara luas puncak area terhadap kadar, ditunjukkan sebagai kurva pada gambar 31.



Gambar 24a . Profil kromatogram HPLC kolestrol, stigma-sterol dan sitosterol standar

A. kolesterol B. stigmasterol C. sitosterol

b . Profil kromatogram HPLC fraksi III dari fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis*

Tabel 6. Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram HPLC (gambar 24)

| Gambar a | | | Gambar b | | |
|-------------|------------|------|-------------|------------|------|
| kode puncak | Rt (menit) | RRt* | kode puncak | Rt (menit) | RRt* |
| 3 | 15,60 | 1,00 | | 15,20 | |
| 4 | 16,60 | 1,06 | 3' | 15,40 | 1,00 |
| 5 | 18,90 | 1,21 | 4' | 16,60 | 1,07 |
| | | | 5' | 18,90 | 1,22 |

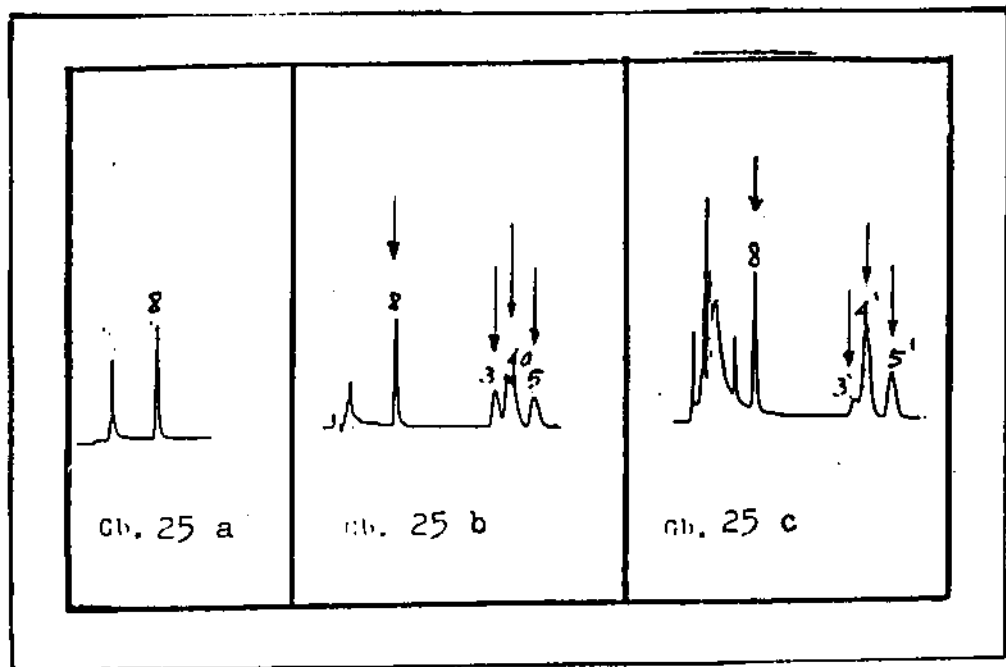
* waktu retensi relatif

Keterangan

| | |
|------------------------|--------------------------|
| 3 = kolestrol | 4' = stigmasterol sampel |
| 3' = kolesterol sampel | 5 = sitosterol |
| 4 = stigmasterol | 5' = sitosterol sampel |

Kondisi percobaan

kolom : ODS Zorbax
suhu : 40° C
fase gerak : Metanol : air 99 : 1
kecep. aliran : 1 ml/menit
detektor : uv 205 nm



Gambar 25 a. Profil kromatogram HPLC diosgenin standar

- b. Profil kromatogram HPLC campuran kolesterol, stigmasterol, sitosterol standar dengan diosgenin sebagai standar internal.
- c. Profil kromatogram HPLC fraksi III dari fase petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis* dengan diosgenin sebagai standar internal

Tabel 7. Pembacaan waktu retensi dan hasil perhitungan waktu retensi relatif dari puncak-puncak kromatogram HPLC (gambar 25).

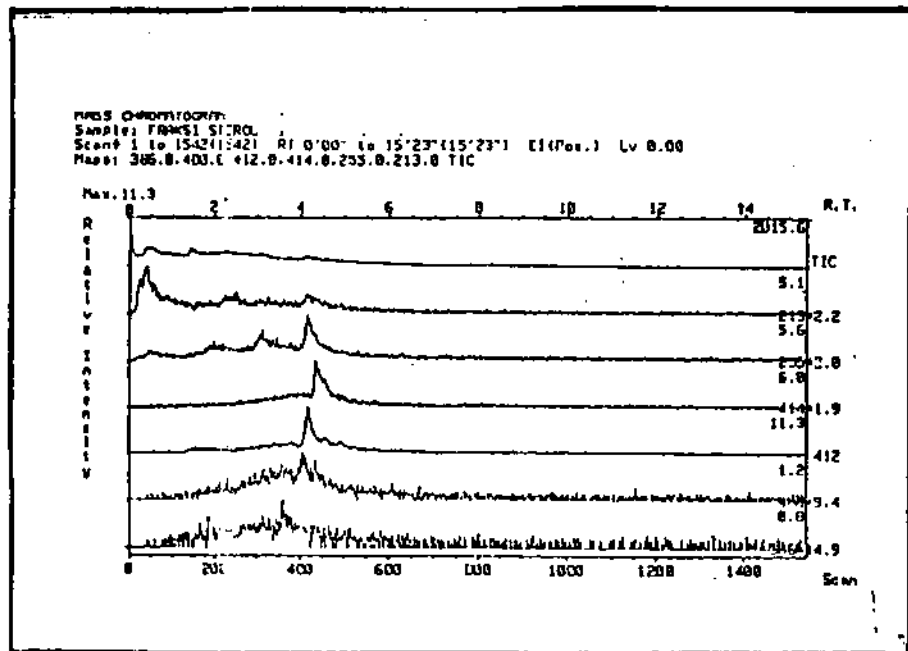
| Gambar a | | | Gambar b | | | Gambar c | | |
|----------|------|--------------|----------|------|-------------|----------|------|-------------|
| Rt | RRt* | kode. puncak | Rt | RRt* | kode puncak | Rt | RRt* | kode puncak |
| 6,8 | 1 | 8 | 6,8 | 1 | 8 | 6,8 | 1 | 8 |
| | | | 15,1 | 2,2 | 3 | 15,4 | 2,2 | 3' |
| | | | 16,2 | 2,4 | 4 | 16,2 | 2,4 | 4' |
| | | | 16,7 | 2,5 | 4a | | | |
| | | | 18,5 | 2,7 | 5 | 18,5 | 2,7 | 5' |

Keterangan

| | |
|--------------------------|------------------------|
| 3 = kolesterol standar | 4a = kampesterol |
| 3' = kolesterol sampel | 5 = sitosterol standar |
| 4 = stigmasterol standar | 5' = sitosterol sampel |
| 4' = stigmasterol sampel | 8 = diosgenin standar |

Kondisi percobaan

kolom : ODS Zorbax
 suhu : 40° C
 fase gerak : Metanol : air 99 : 1
 kecep. alir : 1 ml/menit
 detektor : uv 205 nm



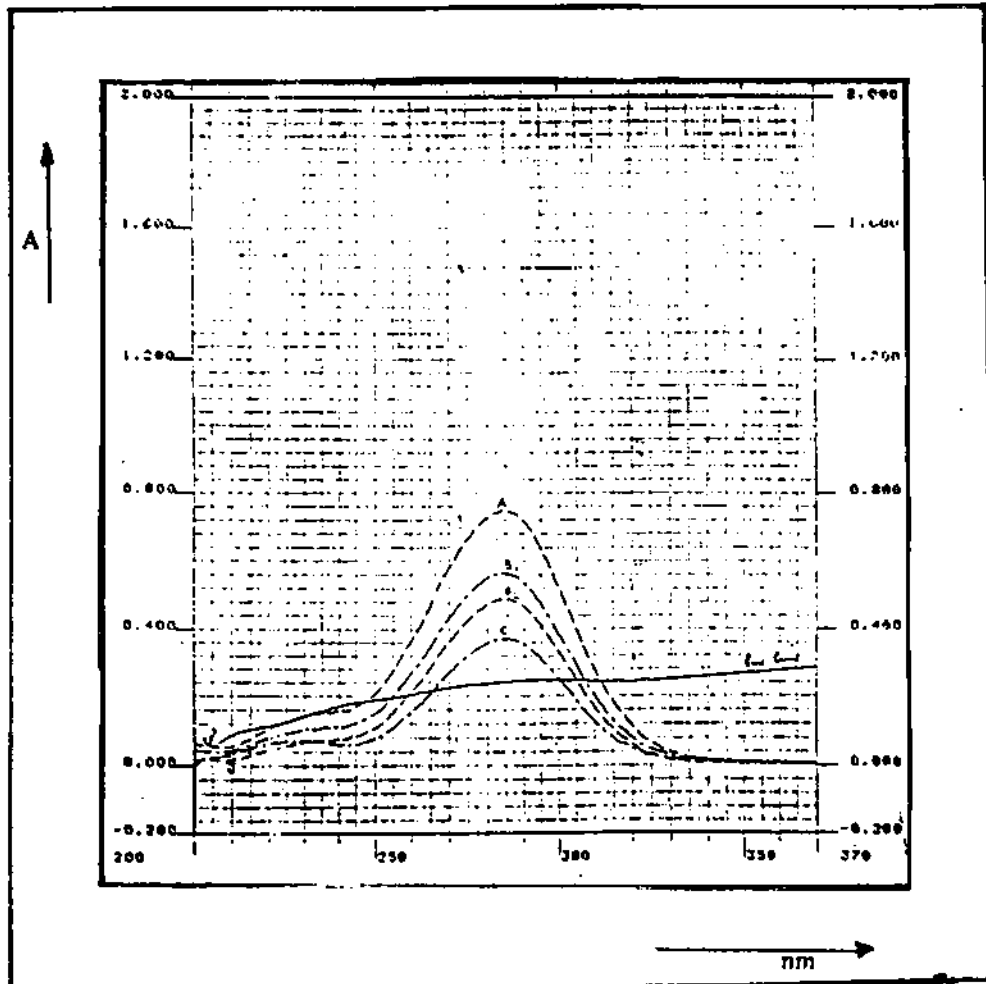
Gambar 26. Kromatogram massa fraksi sterol fasa petroleum eter ekstrak kalus *Agave amaniensis*

Kondisi percobaan

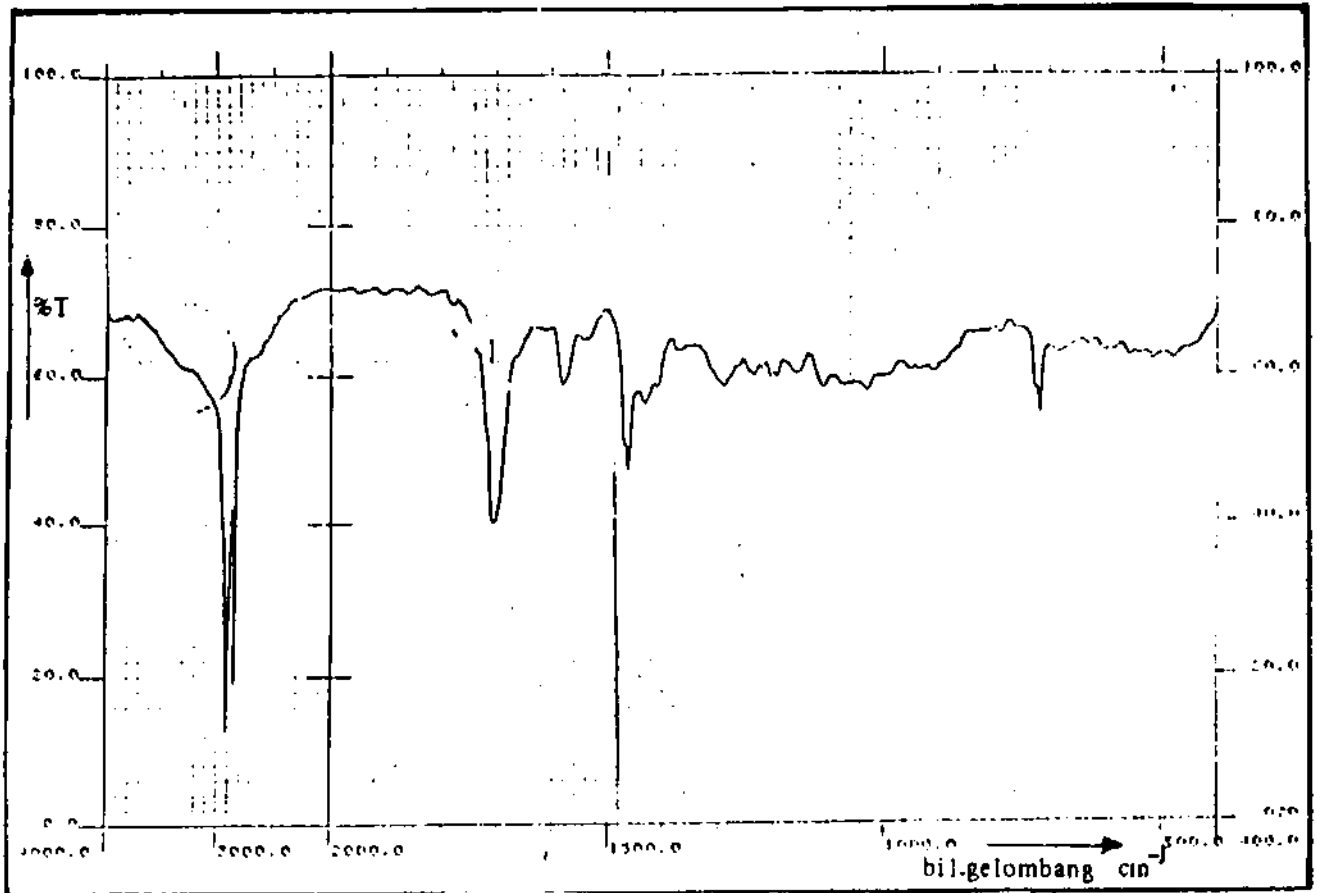
kolom : fused silica kapillar saule FS OV-17 10 m x 0,32 mm kat. 3320-52

suhu : 220° C

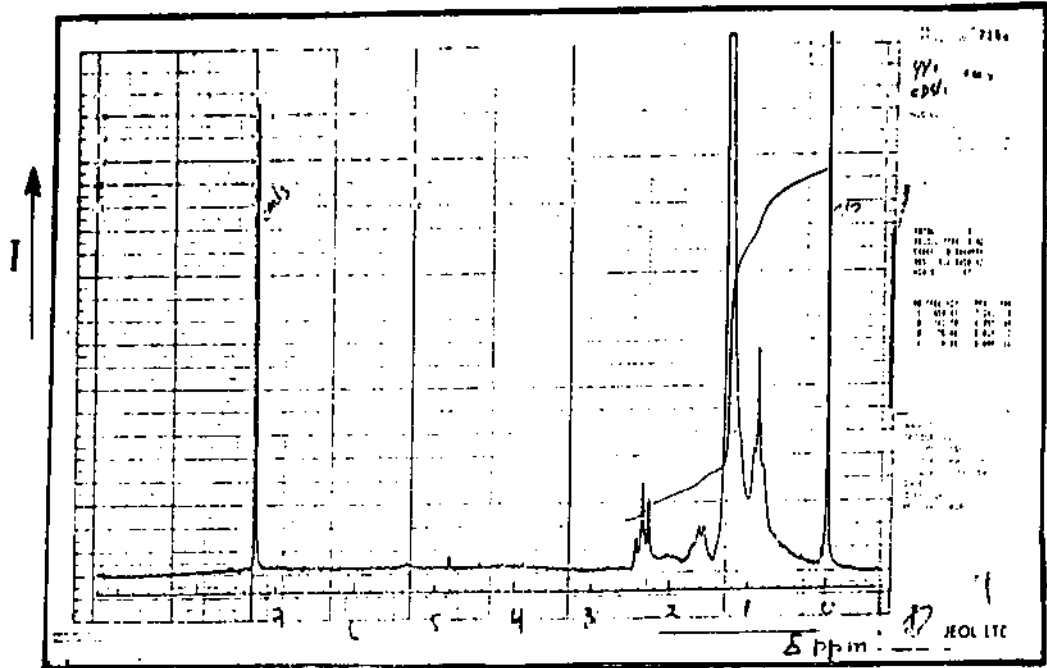
ionisasi : EI, 70 eV



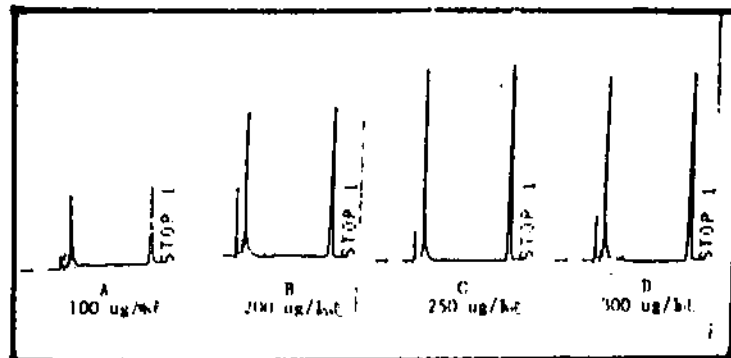
Gambar 27 : Spektra ultra violet kromatogram dengan TLC Scanner Shimadzu CS930 isolat fraksi V fase kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis*



Gambar 28 : spektra IR dari isolat fraksi V fasa kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis*

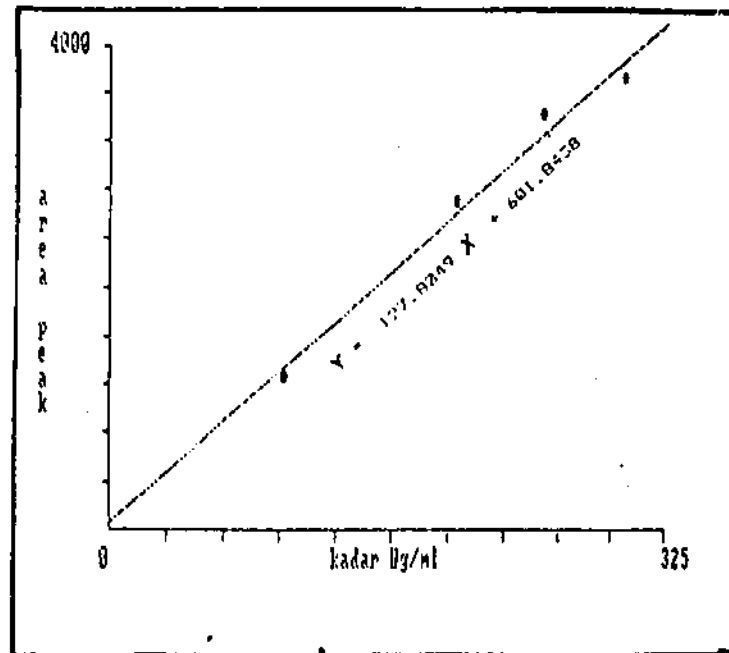


Gambar 29 : spektra H-NMR dari isolat fraksi V fasa kloroform ekstrak kalus *Agave amaniensis*



Gambar 30 . Kromatogram HPLC kolesterol standar kuantitatif

- | | |
|--------------|--------------|
| a. 100 ug/ml | c. 250 ug/ml |
| b. 200 ug/ml | d. 300 ug/ml |



Gambar 31 . Kurva linier kolesterol standar

analisa korelasi dan regresi*

| X | Y | (X-X _p) | (Y-Y _p) | (X-X _p)(Y-Y _p) |
|-----|-------|---------------------|---------------------|--|
| 100 | 12600 | -112.5 | -15260.38 | 1716792 |
| 100 | 12616 | -112.5 | -15144.38 | 1703742 |
| 200 | 26741 | -12.5 | -1019.375 | 12742.19 |
| 200 | 27183 | -12.5 | -577.375 | 7217.188 |
| 250 | 34390 | 37.5 | 6629.625 | 248610.9 |
| 250 | 34114 | 37.5 | 6353.625 | 238260.9 |
| 300 | 37341 | 87.5 | 9500.625 | 830304.7 |
| 300 | 37198 | 87.5 | 9437.625 | 825792.2 |

X = kadar Ug/ml
Y = area peak

X_p = 212.5
Y_p = 27760.38
JUMLAH (X-X_p) = 0
JUMLAH (Y-Y_p) = 0
JUMLAH (X-X_p)(X-X_p) = 43750
JUMLAH (Y-Y_p)(Y-Y_p) = 7.287613E+08
JUMLAH (X-X_p)(Y-Y_p) = 5591463

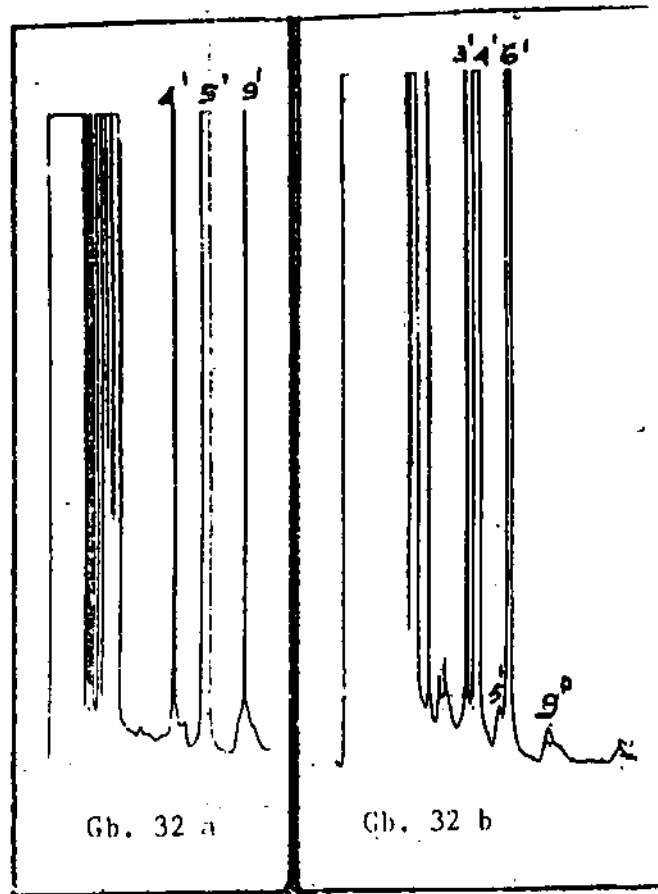
ANTARA KEDUA PARAMETER INI ADA KORELASI
KARENA r HITUNG (.9902339) LEBIH BESAR DARI r TABEL (.787)

KOEFISIEN KORELASI = .9902339

PERSAMAAN GARIS REGRESINYA ADALAH:
Y = 127.8849 X + 601.8438

PERSAMAAN GARIS REGRESI MELALUI TITIK NOL :
Y = 130.3311 X

*dilakukan perhitungan dengan komputer program analisa statistik dari LKN Bandung.



Gambar 32 a. Profil kromatogram HPLC cuplikan I ekstrak kalus *Agave amaniensis*

b. Profil kromatogram HPLC cuplikan II ekstrak kalus *Agave amaniensis*

Tabel 8. Hasil perhitungan estimasi kadar sterol total dan sterol bebas yang terdeteksi dalam kalus *Agave amaniensis* terhadap kolesterol secara HPLC

| | Cuplikan I | Cuplikan II |
|--------------|------------------------|------------------------|
| | sterol bebas (mg/g) | sterol total (mg/g) |
| kolesterol | - | 0,70 |
| stigmasterol | 0,07 | 1,40 |
| sitosterol | 0,30 | 0,10 |
| JUMLAH | 0,37 | 2,20 |

(n = 2)

BAB V

PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan isolasi serta identifikasi steroid dari kalus *Agave amaniensis*, dilakukan optimasi kultur kalus. Hasilnya terlihat dari tabel 2, dan gambar histogram pertumbuhan kalus; bahwa diantara media yang dicoba, kalus tumbuh paling cepat pada media MS yang ditambah dengan hormon 2,4-D sebesar 0,5 ppm dan kinetin sebesar 5 ppm. Penilaian media ini dilakukan dengan tujuan agar selama penelitian bisa didapat jumlah kalus yang cukup. Walaupun belum dapat dikatakan bahwa susunan media yang digunakan dalam penelitian ini adalah yang terbaik, namun pada media tersebut sudah dapat diperoleh kalus yang untuk keperluan penelitian ini sudah cukup memuaskan.

Ekstraksi steroid dilakukan secara bertahap dengan polaritas pelarut yang makin meningkat, untuk memisahkan sterol bebas yang larut dalam pelarut non polar dari glikosterin, sapogenin steroid dan alkaloid steroid. Senyawa lain yang mungkin ikut terekstraksi bersama sterol adalah skualen, triterpen dan lain-lain (33).

Hasil KLT fase petroleum eter (gambar 16a) nampak ada 6 (enam) bercak yang dominan, sedangkan dengan eluen yang berbeda (gambar 16b) bercak yang nampak ada 8 (delapan). Diantara bercak-bercak tersebut ada yang mempunyai harga Rf dan warna yang sama dengan pembanding skualen, triterpen serta campuran sterol yang terdiri dari

kolesterol, stigmasterol dan sitosterol.

Pada hasil KLT dari fase aseton, dengan eluen CHCl_3 : Metanol 6 : 1 terlihat 3 (tiga) bercak yang ketiganya mempunyai Rf yang berbeda dengan sterol pembanding (gambar 17). Namun setelah dihidrolisis nampak ada bercak yang sama dengan sterol pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa pada fase aseton diduga adanya senyawa golongan glikosterin yang pada hidrolisis pecah menjadi sterol dan gula (33).

Pada fase kloroform, di elusi dengan dua macam pelarut yaitu kloroform : etilasetat 9 : 1 dan kloroform : metanol 19 : 3. Dengan penampak anisaldehyd sulfat kedua eluen memberikan jumlah noda yang sama; hanya harga Rf yang berbeda (gambar 18). Dari ketujuh noda yang nampak satu diantaranya mempunyai harga Rf yang sama dengan pembanding campuran sterol ($R_f = 0,60$ pada eluen pertama); $R_f = 0,81$ pada eluen kedua) dan satu noda lagi ($R_f = 0,25$ pada eluen pertama dan $R_f = 0,67$ pada eluen kedua) nampak lebih dominan, menyerap sinar ultra violet dan memberikan warna biru tosca yang tajam. Adanya noda yang diduga sama dengan sterol-sterol, kemungkinan disebabkan karena ekstraksi dengan pelarut non polar petroleum eter kurang sempurna, juga mungkin disebabkan karena adanya sterol hasil pemecahan hidrolisa dari glikosterol.

Dari hasil KLT ekstrak kasar ini dapat diduga bahwa kalus *Agave amaniensis* mengandung senyawa-senyawa sterol baik dalam bentuk bebas atau terikat sebagai

glikosida; triterpen dan skualen.

Berdasar hasil KLT, terhadap masing-masing fase dilakukan kromatografi kolom dengan fase gerak yang memberikan pemisahan terbaik.

Dari fase petroleum eter didapat tiga fraksi (gambar 19). Fraksi I diduga banyak mengandung skualen, sedangkan fraksi III menunjukkan bercak-bercak yang didominasi oleh sterol-sterol. Fraksi II yang didapat jumlahnya sangat sedikit sehingga tidak berhasil diperoleh kristalnya.

Dari analisis dengan kromatografi gas, fraksi I fase petroleum eter yang pada KLT diduga mengandung skualen, memberikan puncak dengan waktu retensi relatif maupun waktu retensi yang sama dengan skualen pembanding (gambar 21). Sedangkan fraksi II (gambar 22) menunjukkan bahwa puncak-puncak 6' dan 7' mempunyai waktu retensi yang lebih lama dibanding dengan sterol-sterol.

Sesuai dengan hasil kromatografi kolom serta KLT (gambar 18), fraksi II fase petroleum eter diduga mengandung senyawa triterpen.

Pada kromatogram GC fraksi III fase petroleum eter; nampak puncak-puncak dengan waktu retensi sama dengan puncak-puncak dari campuran sterol pembanding (gambar 23). Dari percobaan ini juga terlihat adanya perbedaan resolusi oleh karena perbedaan kolom. Kolom kapiler menunjukkan hasil pemisahan yang lebih baik.

Hasil kromatografi gas ini menguatkan dugaan bahwa kalus

Agave ananiensis mengandung skualen (prekursor steroid) dan sterol-sterol yaitu kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol.

Untuk konfirmasi hasil dari kromatografi gas, dilakukan analisis fraksi III fase petroleum eter (sterol-sterol) dengan HPLC dengan eluen MeOH : air 99 : 1 (gambar 24); nampak puncak-puncak dengan waktu retensi yang sama dengan sterol pembanding yaitu kolesterol, stigmasterol dan sitosterol. Analisis juga dilakukan dengan standar internal (gambar 25). Dengan diosgenin sebagai standar internal, kromatogram fraksi sterol juga menunjukkan puncak yang mempunyai waktu retensi relatif sama dengan campuran sterol pembanding.

Fraksi sterol yang diperoleh dari kromatografi kolom fase petroleum eter berhasil direkristalisasi, dan kristal yang diperoleh di analisis dengan GCMS. Kromatogram massa yang diperoleh menunjukkan adanya komponen yang mempunyai molekul ion identik dengan kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol (gambar-26), yaitu 386, 400, 412, 414 dan fragmen spesifik untuk sterol yaitu 213 dan 255 (33). Namun pada percobaan ini tidak berhasil diperoleh spektra massa yang baik oleh karena kolom yang dipakai tidak cukup baik (terlalu pendek) untuk dapat memisahkan komponen sterol tersebut.

Dari hasil analisis fisika kimia memakai KLT, GC, HPLC dan kromatogram massa dapat disimpulkan bahwa kalus

Agave amaniensis mengandung skualen, kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol serta triterpen tertentu. Meskipun demikian, untuk mengambil kesimpulan yang absolut perlu dilakukan analisa yang lebih rinci dengan alat GCMS yang mempunyai kolom yang sesuai. Diosgenin dan hekogenin yang merupakan senyawa spesifik dari genus ini ternyata tidak terdeteksi. Hal ini sangat menarik untuk dikaji pada penelitian yang akan datang, 'mengapa' pada sistem kalus ini keseimbangan metabolisme cenderung ke kiri (lebih mengarah pada prekursor dan bukan pada hasil yang 'final') seperti juga banyak dilaporkan pada sistem kalus yang lain seperti *Solanum mammosum*, *Solanum wrightii*, *Costus speciosus* dan lain-lain (32,33). Pengetahuan ini sangat diperlukan dalam usaha untuk mempelajari biosintesis steroid pada sel tanaman secara rinci. Adanya triterpen pada sistem kalus ini tidak terlalu mengherankan karena jalur biosintesis steroid dan triterpen adalah sama berasal dari skualen. Pada analisa kuantitatif dengan HPLC, estimasi kadar dihitung terhadap kolesterol standar dengan kemurnian cukup tinggi (99%) dibanding dengan standar sterol yang lain. Dari tabel 8 halaman 74, dapat dilihat bahwa kadar sterol total dari sampel yang dihidrolisa dulu lebih besar daripada kadar yang diperoleh dari sampel yang tidak dihidrolisa. Hal ini memperkuat dugaan bahwa pada kalus *Agave amaniensis* senyawa sterol juga dapat dapat diketemukan dalam bentuk ikatan glikosidanya.

Untuk memastikan adanya glikosida sterol pada

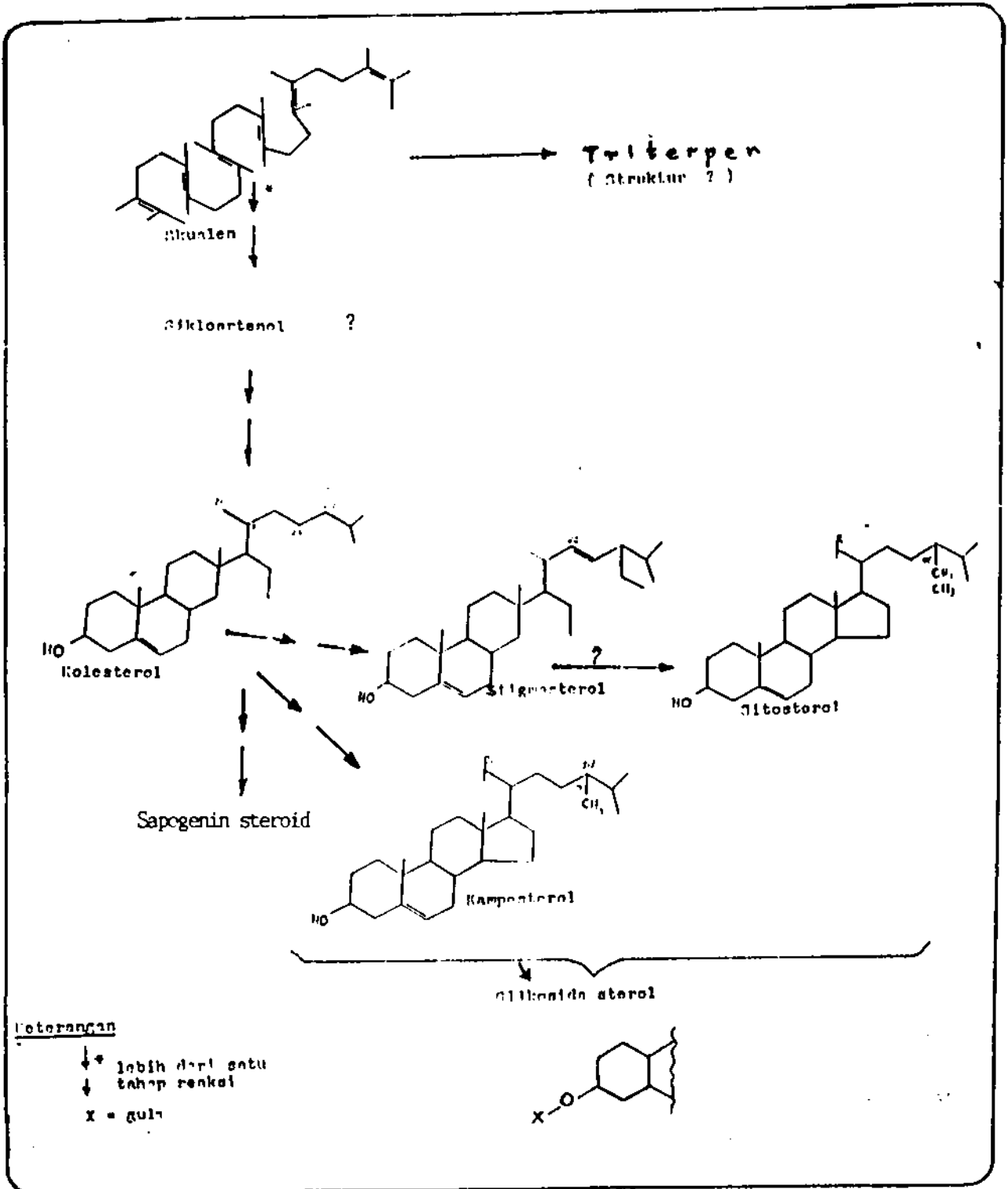
kalus ini maka perlu dilakukan isolasi senyawa tersebut dari fraksi aseton.

Selain senyawa-senyawa sterol di atas, dari fase kloroform berhasil didapat suatu isolat yang pada identifikasi dengan KLT dengan fase gerak kloroform : etil asetat dan penampak bercak anisaldehyd sulfat memberikan warna biru tosca yang tajam dan harga R_f lebih kecil dibanding sterol (gambar 18). Demikian juga bila digunakan penampak bercak asam sulfat 50 % dalam metanol. Pada analisis dengan spektra IR serta H-NMR, memberikan profil spektra yang menunjukkan adanya kerangka inti steroid (40). Pada analisis dengan spektrometer IR, senyawa-senyawa steroid memberikan serapan kuat yang khas pada daerah antara 2800 cm^{-1} dan 3350 cm^{-1} . Sedangkan dengan spektrometer H-NMR menghasilkan pita lebar pada daerah pergeseran $1 - 2,5\ \delta$, dengan dua puncak yang tajam pada daerah pergeseran $0,6 - 1,5\ \delta$. Dengan TLC Scanner (gambar 27) terlihat bahwa isolat tersebut menyerap sinar UV pada panjang gelombang $\pm 285\text{ nm}$. Data-data tersebut mengarahkan pada dugaan bahwa isolat yang diperoleh kemungkinan golongan steroid yang mengandung suatu gugus yang aktif terhadap sinar ultra violet dan mempunyai polaritas mirip dengan sapogenin steroid/alkaloid steroid.

Dari uraian diatas menunjukkan bahwa sel tanaman *Agave amaniensis* mampu melakukan biosintesis senyawa steroid sampai tahap sterol (kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol), kemudian berlanjut ke bentuk

glikosida sterol dan suatu steroid lain pada fase kloroform (diduga sapogenin steroid) yang lebih polar dan pada penelitian ini belum teridentifikasi dengan jelas.

Untuk mempelajari tahap-tahap biosintesis dengan jelas, perlu juga dilakukan penentuan struktur dari senyawa triterpen (lihat gambar 33 di halaman berikut). Disamping itu, perlu juga dipelajari pengaruh faktor-faktor tertentu misalnya makro dan mikro elemen, sumber karbon, nitrogen dan lain-lain terhadap pembentukan steroid.



Gambar 33 . Perkiraan biosintesis senyawa steroid pada kalus *Agave amaniensis*

BAB VI

KESIMPULAN

Berdasarkan karakterisasi fisika kimia yang dilakukan, kalus *Agave amaniensis* mengandung prekursor steroid yaitu skualen, sterol-sterol bebas (kolesterol, stigmasterol, kampesterol dan sitosterol), glikosida sterin dan senyawa triterpen tertentu serta suatu sapogenin steroid yang pada penelitian ini belum teridentifikasi dengan lengkap.

Sedangkan senyawa hekogenin yang merupakan senyawa spesifik pada tanaman *Agave amaniensis*, dengan metode yang digunakan tidak terdeteksi.

BAB VII

SARAN-SARAN

Senyawa triterpen tertentu yang terdeteksi serta isolat dari fase kloroform yang berhasil dikristalisasi pada penelitian ini dan diduga senyawa steroid, sangat menarik untuk ditentukan strukturnya.

Perlu dipelajari lebih lanjut faktor-faktor yang mempengaruhi biosintesis steroid pada sel tanaman *Agave amaniensis*.

BAB VIII

DAFTAR PUSTAKA

1. Berlin J, Formation of Secondary Metabolites in Cultural Plant Cells and its impact on Pharmacy, In : Bayai Y P S, (ed.), Biotechnology, Agriculture and Forestry, vol. , Springer verlag, 1988, 37 - 39.
2. Verpoorte R, Journal of Ethnopharmacology, 1988, 25 : 43-59.
3. Rhodes M J C, et al., New Zealand Journal of Technology, 1986, 2 : 59 - 70.
4. Bruhn J G , Acta Pharm. Nord, 1989, 1: 117-127.
5. Shuler M L , Ann. N Y Aca. of Sci., 1982, 369
6. Anderson L A, Philipson J D, Robert M F, Biosynthesis of Secondary Products by Cell Cultures, In: Advances in Biochemical Engineering, 1985, 31, Springer Verlag.
7. Misawa M, Production of Useful plant metabolites. In: Flechter, A. (ed), Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology, 1985, Vol. 31, Springer Verlag, p. 59-84.
8. Stoekigt J, Schmidt D, Ruyter C M, Deutsche Apotheker Zeitung, 1989, 129: 2767-2772
9. Neumann B D, Zenk M H, Gewinnung von Pflanzeninhalstoffen mit hilfe Pflanzlicher Zellkulturen, 1985, BMFT-Status-Seminar, Juelich, Germany.
10. Heide L, Bioengineering, 1988, 4: 93-95.
11. Rokem J S, et al., Journal of Natural Products, 1985, 48: 210 - 222.
12. Nickel L G, Products, In: Staba, (ed.), Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals, 1980, CRC Press.
13. Granitza A J, The International Drug Market, In: Drugs in Germany, 1988, 31, 1.
14. Varro E T, et. all, Pharmacognosy, 1981, Lee and Febiger, Philadelphia, 164-194
15. Mannitto P, Biosynthesis of Natural Product, 1981, John Willey and Sons, New York, Chishester, Brisbane, Toronto, 314 - 345.

16. Oei Ban Liang, Asparton Y, Musrir N, Sapogenin Steroid Sisal, 1983, Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat III, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 352 - 378.
17. Esti Hendradi, Isolasi Kandungan Daun *Agave sisalana* Perrine, 1984, Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
18. Rini Dhamayanti, Skrining Steroid dari Daun Beberapa Jenis *Agave*, 1988, Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
19. Dewi S, Percobaan Penumbuhan Kalus *Agave amaniensis* Serta Deteksi Steroidnya, 1988, Skripsi Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
20. Strassburger E, et al. Lehrbuch der Botanik fur Hochshulen, 1971, 30 Auflagee, Gustav, Fisher, Verlag, Stuttgart, p. 584, 626, 722, 726, 729.
21. Blunden G, Yiyi, Jewers K, Steroidal Sapogenin from Leaves of *Agaveae* species, 1978, *Phytochemistry*, vo. 17, p. 1923 - 1925.
22. Blunden G, Carabot C A, Jewers K, Steroidal Sapogenin from Leaves of Some Species of *Agave* and *Furcraceae*, 1980, *Phytochemistry*, 19 : 2489 - 2490.
23. Indrayanto G, Rahman A, Aplikasi Bioteknologi Sel Tanaman Untuk Bidang Farmasi, dalam : Kumpulan Makalah Seminar Sehari Bioteknologi Ditinjau dari Berbagai Disiplin Ilmu, 1989, Unair, Surabaya.
24. Puhan Z, Martin S M, The Industrial Potential of Plant Cell Cultures Progress in Industrial Microbiology, 1971, Nat. Res. Counc. Canada, 13 - 39.
25. George E F, Sherrington P D, Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories, 1984, Exegetic Ltd., England.
26. Evans, Sharp, Ammirato, Yamada, Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding, 1983 Macmillan Publishing Co. Canada, 52, 56 - 57.
27. Tabata M, Recent Advances in the Production of Medicinal Substances by Plant Cell Cultures. dalam : Barz W (ed), Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application, 1977, Springer-verlag Berlin, New York. 3 - 13
28. Spoerle J, Becker H, Deutcher Apotheker Zeitung, 1989, 128: 2623-2628
28. Holden P R, Holden M A, Yeoman M M, Variation in the

Secondary Metabolites of Cultured Plant Cells in: Robin RJ & Rhodes M J C (ed) Manipulating Secondary Metabolism in Culture, 1988, Cambridge, 15-29

30. Ellis B E, Natural Product Reports, 1988, 5 : 581-612
31. Stoegikt J, Schuebel H, Deutsche Apoteker Zeitung, 1988, 129: 1187 - 1191.
32. Indrayanto G, et al. Planta Medica, 1986 , 413.
33. Indrayanto G, Ph.D. Thesis, University of Tuebingen, 1983.
34. Carle R, Ph.D. Thesis, University of Tuebingen, 1979.
35. Helmbold H, Ph.D. Thesis, University of Tuebingen, 1977
36. Khanna P, Mohan S, Diosgenin, Gitogenin and Tigogenin from *Trigonella foenum graecum* Tissue Cultures, 1973, Lloydia, 36: 96
37. Wink M, Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites with Special Reference to Alkaloids, in: Vasil K (ed), Cell Cultures and Somatic Cell Genetics of Plants, 1988, Academic Press, 5: 18-35
38. Roberts M F, Factors Affecting Alkaloid Production in Plant Cell Cultures, in: Martin B (ed), Plant Vacuoles, 1987, NATO ASI Series, Plenum Press, 503-508
39. Peterson M, Alfermann A W, Zeitschrift fuer Naturforschung, 1988, 43 e: 501-504
40. Gorog S D S, Szasz C Sc, Analysis of Steroid Hormone Drugs, 1978, Elsevier and Co., New York.
41. Luckner M, Vasudevan T N, Secondary Metabolism in Plants and Animals, in : Steroids, 1972, 122 - 164.
42. Hanzel R, Pharmazeutische Biologie, 1980 Allgemeiner Teil Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 57 - 97
43. Heftmann E, Chromatography of Steroids, 3rd edition, 1975, Van Nostrand Reinhard Company.
44. Indrayanto G, Aplikasi Kromatografi Gas Cair Untuk analisis Steroida Nabati dalam : Majalah Farmasi Airlangga 1990, 1: 27 - 30
45. Stahl Egon, Dunnschicht Chromatographie, 1967 Springer Verlag, Berlin
46. Willard H H, Lynne L M J R, Frank A S J R, Instrumental

Methods of Analysis 6 th Ed.1981, D Van Nostrand Co, New York 454 - 486 ; 515 - 627.

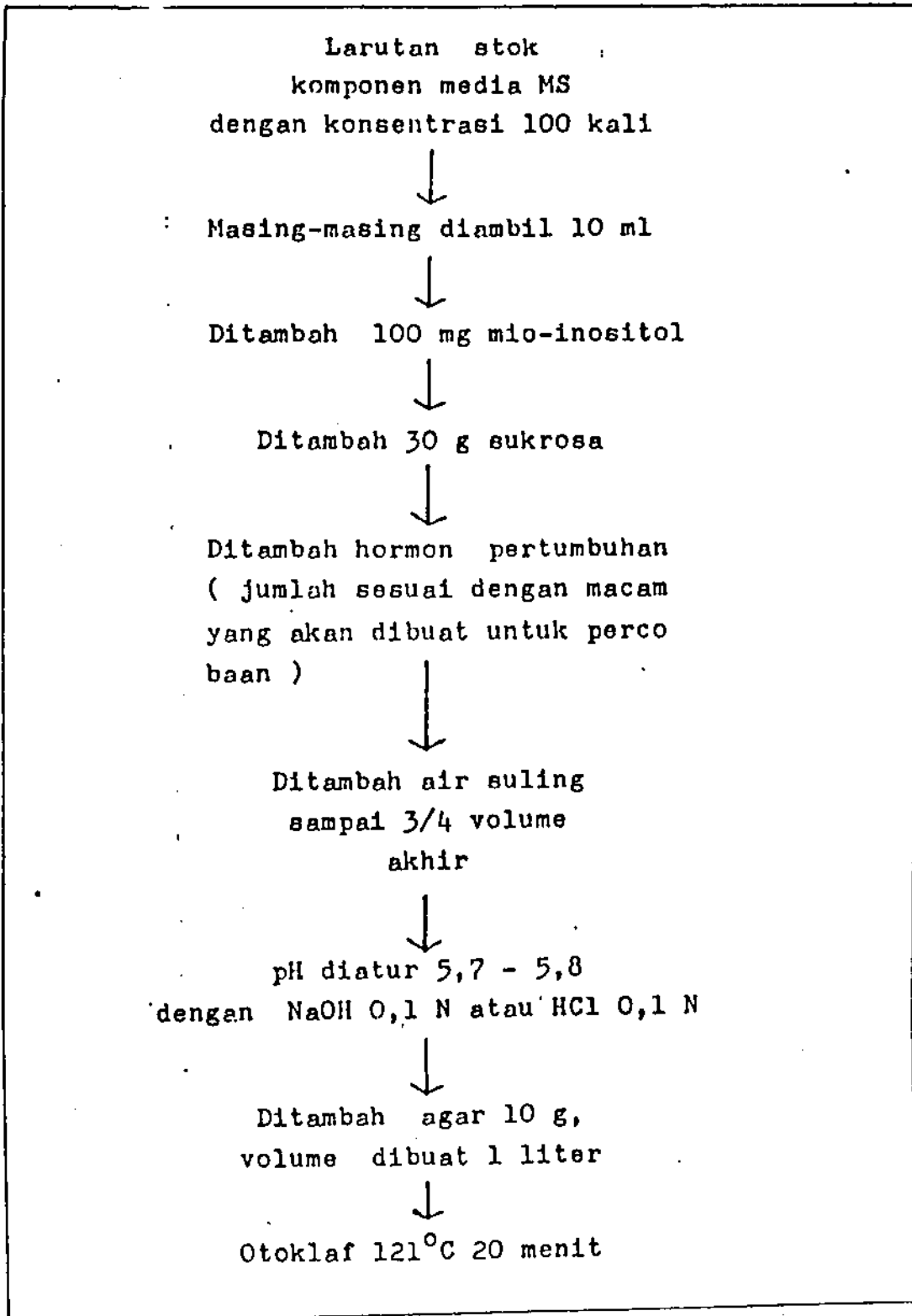
47. Groenedijk H, Disertasi Doktor, Universitas Eindhoven, 1970.
48. Jennings W G, Application of Gas Capillary Gas Chromatography, 1981, Marcel Dekker Inc, New York, Basel, chapter 8
49. Santosa M H, Indrayanto G, Pudjiarti S, HPLC, Bahan Kursus Analisis Multikomponen, 1988, UNAIR, Surabaya.
50. Indrayanto G, Aplikasi HPLC Untuk Kontrol Kualitas Obat-obatan, 1987, imposium HPLC, UNAIR, Surabaya
51. Canales M, Computer-Assisted Optimization of Isocratic Mobile Phase, In : LC in Pharmaceutical Development, an Introduction, Aster Publishing Corporation, 1985, 181-214
52. Issaq H J, Muschik G M, Janini G M, Journal of Liquid Chromatography, 1983, 6 (2), 259 - 269
53. JT Baker Chemical & Co, HPLC Solvent Reference Manual, 1985, 4 - 5.
54. Dodd J S, Robert L W, Experiment in Plant Tissue Cultures, 1982, Cambridge University Press, London, New York, p. 1-47, 54-55, 149-153.
55. Nyoman Y, Optimasi Komposisi Fase Gerak Metanol : Air pada Analisis Kualitatif Solasodin, diosgenin, solanidin kolesterol dan stigmasterol dengan metode HPLC, 1988, Skripsi Fakultas Farmasi UNAIR, Surabaya
56. Goad L J, Aspect of Phytosterol Biosynthesis, in: Pridam J B, Terpenoids in Plants, 1967, London, 159-190.
57. Cresswell J C, Runquist A R, Campbell M M, Analisis Spektrum Senyawa Organik, 1982, Penerbit ITB, Bandung, 78
58. Tschesche R, Leinert J, 16 β -Hydroxycholestanol Als Biogenetische Vorstufe der Steroidsapogenine, Phytochemistry, 1973, Pergamon Press, 12: 1619-1620.
59. Kaneko K, Tanaka M W dan Mitshuhashi H, Dormantinol, A Possible Precursor in Solanidine Biosynthesis, from Budding *Veratrum grandiflorum*, Phytochemistry, 1977, Pergamon Press, 16: 1247-1251.
60. Tschesche R, Brennecke H R, Side Chain Functionalization of Cholesterol in the Biosynthesis of Solasodine in *Solanum laciniatum*, Phytochemistry, 1980, Pergamon Press, 19: 1449-1451.

61. Ronchetti F, Russo G, Ferrara G dan Vecchio G, The Role of (25S)-5 α -cholestan-3 β ,26-diol and (25S)-5 α -furostan-3 β ,26-diol in the Biosynthesis of Tomatidine and Neotigogenin, *Phytochemistry*, 1975, Pergamon Press, 14: 2423-2425.
62. Tschesche R, Spindler M, Zur Biogenese des Aza-oxa-spiran-systems der Steroidalkaloide vom Spirosolan-typ in Solanaceen, *Phytochemistry*, 1978, Pergamon Press, 17: 251-255.
63. Heftmann E, *Steroid Biochemistry*, 1970, Academic Press, London.

Lampiran 1 . Komposisi kimiawi media Murashige & Skoog

| Komponen | Jumlah (mg/l) |
|--|-----------------|
| NH_4NO_3 | 1650 |
| KNO_3 | 1900 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 440 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 370 |
| KH_2PO_4 | 170 |
| KI | 0,83 |
| H_3BO_3 | 6,2 |
| $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ | 22,3 |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 8,6 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 27,8 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 37,3 |
| Mio-inositol | 100 |
| Asam nikotinat | 0,5 |
| Piridoksina HCl | 0,5 |
| Tiamina HCl | 0,1 |
| Glisina | 2 |
| Sukrosa | 30000 |
| Agar | 10000 |

Lampiran 2 . Skema pembuatan media MS



Lampiran 3.

Contoh perhitungan estimasi kadar sterol sampel terhadap kolesterol standar.

Estimasi kadar dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{kadar sampel} = \frac{\text{luas area sampel}}{\text{luas area standar}} \times \text{konsentrasi standar}$$

Sampel ditimbang teliti sebanyak 1 gram, dikocok dengan kloroform 3 x 10,0 ml dengan alat vortex masing-masing selama 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang didapat dikeringkan dengan rotavapor. Residu dilarutkan dalam metanol HPLC sebanyak 1,0 ml. Diambil 15 ul, di analisis dengan HPLC.

Sebagai standar dibuat larutan kolesterol dengan konsentrasi

100 mg/l 5 ul larutan kolesterol standar di analisis dengan HPLC.

Dari kromatogram diperoleh :

luas area puncak kolesterol standar = 9728

luas area puncak kolesterol pada sampel = 4204

$$\text{-----} \rightarrow \text{kadar sampel} = \frac{9728}{4204} \times \frac{5}{15} \times 100 \text{ mg/l}$$

$$= 771,3 \text{ mg/l}$$

$$= 0,77 \text{ mg/g}$$

Dari satu gram kalus kering dilarutkan dalam 1,0 ml pelarut, sehingga dalam satu gram kalus terdeteksi sampel sebesar 0,77 mg/g.